

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA
ÁCIDO GRASO TRANSLOCASA CD36 EN
LA ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO
ALCOHÓLICA Y EN LA HEPATITIS
CRÓNICA POR VIRUS C**

MIGUEL FERNÁNDEZ BERMEJO

TESIS DOCTORAL

2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina
Departamento de Medicina



**CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA ÁCIDO GRASO
TRANSLOCASA CD36 EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA
NO ALCOHÓLICA Y EN LA HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C**

TESIS DOCTORAL

Autor:

Miguel Fernández Bermejo

Directores:

Carmelo García Monzón

Maria Eugenia Miquilena Colina

Ignacio de los Santos Gil

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

D. **CARMELO GARCÍA MONZÓN**, DOCTOR EN MEDICINA Y PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

D^a. **MARÍA EUGENIA MIQUILENA COLINA**, DOCTORA EN MEDICINA E INVESTIGADORA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA PRINCESA

D. **IGNACIO DE LOS SANTOS GIL**, DOCTOR EN MEDICINA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CERTIFICAN

Que Don MIGUEL FERNÁNDEZ BERMEJO, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión la tesis doctoral con el título: **"CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA ÁCIDO GRASO TRANSLOCASA CD36 EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA Y EN LA HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C"**, considerando que reúne los méritos suficientes de calidad y originalidad para optar al grado de Doctor.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman la siguiente certificación en Madrid a quince de septiembre de 2014.

Fdo. Carmelo García Monzón

Fdo. M^a Eugenia Miquilena Colina

Fdo. Ignacio Santos Gil

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carmelo García Monzón, por toda su ayuda y sabios consejos. Le agradezco haberme permitido conocer de cerca el apasionante mundo de la investigación básica, por lo mucho que he aprendido a su lado, por su generosidad, por haberme apoyado de manera totalmente incondicional desde el principio, y como no, por sus horas de dedicación y su esfuerzo. Para mí no solo ha sido el mejor Director de Tesis que he podido tener, sino que me ha demostrado en todo momento que es un amigo al que siempre podré recurrir.

A la Dra. M^a Eugenia Miquilena Colina y al Dr. Ignacio Santos Gil, por haber aceptado ser co-directores de esta tesis, por su dedicación profesional, disponibilidad y colaboración para llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

Dar las gracias a mis compañeros de trabajo que, de un modo u otro, me han apoyado y ayudado en mi trayectoria profesional, y en la culminación de la presente Tesis Doctoral.

A todos los que ocupan un lugar especial en mi vida y que no he podido ver tanto como me hubiera gustado durante la elaboración de este trabajo.

A mi familia, por su apoyo incondicional, por compartir buenos y malos momentos. A Gemma, Álvaro y Myriam, espero que algún día lleguen a entender el motivo por el que durante tantas horas no he podido dedicarles la atención que merecen.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|--------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | IV |
| ÍNDICE DE TABLAS | VII |
| ABREVIATURAS | VIII |
| RESUMEN | X |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Enfermedad hepática grasa no alcohólica | 2 |
| 1.1. Epidemiología | 3 |
| 1.2. Etiología | 4 |
| 1.3. Patogenia | 7 |
| 1.3.1. Resistencia a la insulina | 7 |
| 1.3.2. Resistencia a la insulina y hepatitis C | 10 |
| 1.3.3. Esteatosis | 11 |
| 1.3.4. Esteatosis y hepatitis C | 13 |
| 1.3.5. Esteatohepatitis | 14 |
| 1.4. Historia natural | 16 |
| 1.5. Diagnóstico | 17 |
| 1.5.1. Pruebas de laboratorio | 17 |
| 1.5.2. Pruebas de imagen | 18 |
| 1.5.3. Biopsia hepática | 19 |
| 1.5.4. Marcadores no invasivos de fibrosis hepática | 21 |
| 1.6. Tratamiento | 22 |
| 1.6.1. Medidas generales | 22 |
| 1.6.2. Tratamiento de la resistencia a insulina | 24 |
| 1.6.3. Tratamiento del estrés oxidativo | 25 |
| 1.6.4. Tratamiento hipolipemiante | 25 |
| 1.6.5. Otros tratamientos | 26 |
| 2. Mecanismos de captación celular de ácidos grasos libres | 26 |
| 2.1. Proteínas transportadoras de ácidos grasos Libres | 27 |
| 2.1.1. Proteínas de transporte de ácidos grasos (FATPs) | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1.2. Proteína receptora de ácidos grasos asociada a la membrana plasmática (FABPpm) | 28 |
| 2.1.3. Ácido graso translocasa CD36 (CD36) | 29 |
| 3. Papel de CD36 en la enfermedad hepática grasa no alcohólica | 29 |
| 4. Papel de la fracción soluble de CD36 en la enfermedad hepática grasa no alcohólica | 30 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 32 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 35 |
| 1. Pacientes y controles sanos | 36 |
| 1.1. Pacientes incluidos en el estudio del perfil de expresión de CD36 en el hígado | 36 |
| 1.2. Pacientes incluidos en el estudio de las concentraciones de la fracción soluble de CD36 en el suero | 36 |
| 1.3. Criterios de inclusión | 36 |
| 2. Datos clínicos | 38 |
| 3. Determinaciones analíticas | 38 |
| 4. Biopsia hepática | 39 |
| 5. Estudios en tejido hepático | 39 |
| 5.1. Evaluación histopatológica | 39 |
| 5.2. Análisis de la expresión génica de CD36 por PCR a tiempo real | 42 |
| 5.3. Determinación del contenido proteico de CD36 por Western blotting | 42 |
| 5.4. Análisis inmunohistoquímico del patrón de expresión de CD36 | 43 |
| 6. Estudios en suero | 44 |
| 6.1. Determinación de la concentración de CD36 soluble (CD36s) | 44 |
| 7. Análisis estadístico | 45 |
| 8. Aspectos éticos | 46 |
| RESULTADOS | 47 |
| 1. Estudios en tejido hepático | 48 |
| 1.1. Características de los pacientes y controles sanos | 48 |
| 1.2. Expresión génica de CD36 | 51 |
| 1.3. Contenido proteico de CD36 | 52 |

| | |
|--|------------|
| 1.4. CD36 se expresa predominantemente en la membrana plasmática de los hepatocitos _____ | 54 |
| 1.5. Correlación entre la expresión hepática de CD36 y parámetros metabólicos e histológicos _____ | 57 |
| 2. Estudios en suero _____ | 72 |
| 2.1. Características de los pacientes y controles sanos _____ | 72 |
| 2.2. Concentraciones séricas de CD36 soluble según el diagnóstico histológico _____ | 75 |
| 2.3. Correlación entre las concentraciones séricas de CD36 soluble y parámetros metabólicos e Histológicos _____ | 77 |
| 2.4. Correlación entre las concentraciones séricas de CD36 soluble y el índice de expresión hepático de CD36 _____ | 84 |
| 2.5. Las concentraciones séricas de CD36 soluble se asocian de forma independiente con esteatosis avanzada en pacientes con EHGNA ____ | 85 |
| DISCUSIÓN _____ | 88 |
| CONCLUSIONES _____ | 101 |
| BIBLIOGRAFÍA _____ | 103 |
| ANEXOS _____ | 120 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fisiopatología de la esteatosis _____ | 9 |
| Figura 2. Mecanismos patogénicos de la EHGNA _____ | 16 |
| Figura 3. Los niveles de ARNm de CD36 están anormalmente aumentados en el hígado de los pacientes con EHGNA así como de los pacientes con hepatitis crónica por VHC _____ | 52 |
| Figura 4. Aumento del contenido hepático de la proteína CD36 en los pacientes con EHGNA _____ | 53 |
| Figura 5. Aumento del contenido hepático de la proteína CD36 en pacientes con hepatitis crónica por VHC _____ | 54 |
| Figura 6. Patrón de expresión de CD36 en el hígado de pacientes con EHGNA y con hepatitis crónica por VHC _____ | 55 |
| Figura 7. Incremento del índice de expresión hepático de CD36 en los pacientes con EHGNA y con hepatitis crónica por VHC _____ | 57 |
| Figura 8. Ausencia de correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de masa corporal (IMC) en pacientes con esteatosis simple no alcohólica _____ | 58 |
| Figura 9. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y la concentración plasmática de insulina en pacientes con esteatosis simple no alcohólica _____ | 59 |
| Figura 10. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en pacientes con esteatosis simple no alcohólica _____ | 60 |
| Figura 11. Índice de expresión hepático de CD36 en los pacientes con ESNA en función de la presencia de resistencia a la insulina ($HOMA \geq 2$) _____ | 61 |
| Figura 12. Ausencia de correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de masa corporal (IMC) en pacientes con EHNA _____ | 62 |
| Figura 13. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y la concentración plasmática de insulina en pacientes con EHNA _____ | 63 |
| Figura 14. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en pacientes con EHNA _____ | 64 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el grado histológico de esteatosis en pacientes con EHNA _____ | 65 |
| Figura 16. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el IMC en pacientes con VHC genotipo 1 y esteatosis asociada _____ | 66 |
| Figura 17. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y la concentración plasmática de insulina en pacientes con VHC genotipo 1 y esteatosis asociada _____ | 67 |
| Figura 18. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en pacientes con VHC genotipo 1 y esteatosis asociada _____ | 68 |
| Figura 19. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el grado histológico de esteatosis en pacientes con VHC genotipo 1 y esteatosis asociada _____ | 69 |
| Figura 20. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de masa corporal (IMC) en pacientes con VHC genotipo 1 sin esteatosis asociada _____ | 70 |
| Figura 21. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y la concentración plasmática de insulina en pacientes con VHC genotipo 1 sin esteatosis asociada _____ | 71 |
| Figura 22. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en pacientes con VHC genotipo 1 sin esteatosis asociada _____ | 72 |
| Figura 23. Las concentraciones séricas de CD36s varían en función del diagnóstico histológico _____ | 76 |
| Figura 24. Las concentraciones séricas de CD36s aumentan de manera progresiva en paralelo con el grado de esteatosis en los pacientes con EHNA _____ | 77 |
| Figura 25. Las concentraciones séricas de CD36s no se modifican significativamente en función del grado de esteatosis en los pacientes con hepatitis crónica por VHC _____ | 78 |
| Figura 26. Las concentraciones séricas de CD36s se correlacionan positivamente con el índice de masa corporal (IMC) en los pacientes con EHNA _____ | 79 |

Figura 27. Las concentraciones séricas de CD36s se correlacionan positivamente con la insulina plasmática en los pacientes con EHGNA ____ 80

Figura 28. Las concentraciones séricas de CD36s se correlacionan positivamente con el índice resistencia a la insulina (HOMA) en los pacientes con EHGNA _____ 81

Figura 29. Las concentraciones séricas de CD36s no se correlacionan con el índice de masa corporal (IMC) en los pacientes con hepatitis crónica por VHC _____ 82

Figura 30. Las concentraciones séricas de CD36s no se correlacionan con la insulina plasmática en los pacientes con hepatitis crónica por VHC _____ 83

Figura 31. Las concentraciones séricas de CD36s no se correlacionan con el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en los pacientes con hepatitis crónica por VHC _____ 84

Figura 32. Correlación positiva entre la concentración sérica de CD36s y el índice de expresión hepático de CD36 en la cohorte de pacientes estudiados _____ 85

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Etiología de la enfermedad hepática grasa no alcohólica _____ | 6 |
| Tabla 2. Clasificación de las lesiones histológicas en EHGNA _____ | 21 |
| Tabla 3. Características de la población con enfermedad hepática grasa no alcohólica y con hígado normal incluida en el estudio histológico _____ | 49 |
| Tabla 4. Características de los pacientes con hepatitis crónica por virus C incluidos en el estudio histológico _____ | 50 |
| Tabla 5. Características de la población con enfermedad hepática grasa no alcohólica y con hígado normal incluida en el estudio serológico _____ | 73 |
| Tabla 6. Características de los pacientes con hepatitis crónica por virus C genotipos 1 y 2 incluidos en el estudio serológico _____ | 74 |
| Tabla 7. Modelos de regresión logística que analizan la asociación entre la presencia de esteatosis avanzada (grado ≥ 2) en pacientes con EHGNA y las concentraciones séricas de CD36s y otras variables _____ | 86 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| ACC | Acetil-CoA carboxilasa |
| ACL | ATP-citrato liasa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| AGL | Ácidos grasos libres |
| Akt | Proteína kinasa B |
| ALT | Alanino aminotransferasa |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| AST | Aspartato aminotransferasa |
| AUROC | Área bajo la curva ROC |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| ChREBP | Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos |
| CD36 | Ácido graso translocasa CD36 |
| CD36s | Fracción soluble de la ácido graso translocasa CD36 |
| CPT-I | Carnitina palmitiltransferasa I |
| CRM | Cadena respiratoria mitocondrial |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| EGTA | Ácido etilenglicol-bis (beta-aminoetiléter) -N,N,N',N'-tetraacético |
| EHGNA | Enfermedad hepática grasa no alcohólica |
| EHNA | Esteatohepatitis no alcohólica |
| ELF | Enhanced Liver Fibrosis. Índice no invasivo para la estimación de la fibrosis |
| ELISA | Enzimoimmunoanálisis de absorción |
| ESNA | Esteatosis simple no alcohólica |
| FA | Fosfatasa alcalina |
| FABPpm | Proteína receptora de ácidos grasos asociada a la membrana plasmática |
| FAS | Ácido graso sintetasa |
| FATPs | Proteínas de transporte de ácidos grasos |
| FoxO1 | Forkhead box 1 |
| GGT | Gamma-glutamyltranspeptidasa |
| HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| HOMA | Índice de resistencia a la insulina |
| IMC | Índice de masa corporal |

| | |
|------------------------------------|--|
| IKK-β | Proteína kinasa de IK β . |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-1β | Interleucina 1 β |
| LCE | Elongasa de cadena larga |
| LDN | Lipogénesis de novo |
| LH | Lipasa hepática |
| LHS | Lipasa hormono-sensible |
| LPL | Lipoproteína lipasa |
| LXR | Receptor X hepático |
| MTP | Proteína de transferencia microsomal de triglicéridos |
| NAFLD | (fibrosis score) Índice no invasivo para la estimación de la fibrosis en la enfermedad hepática grasa no alcohólica |
| NF-$\kappa\beta$ | Factor nuclear de $\kappa\beta$ |
| OR | Odds ratio, posibilidad de que un evento se presente en un grupo de población frente al riesgo de que ocurra en otro |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PKC | Proteína kinasa C |
| PMSF | Fenilmetanosulfonato |
| PXR | Receptor X pregnano |
| PPAR-γ | Receptor activador de la proliferación de peroxisomas gamma |
| QM | Quilomicrones |
| RI | Resistencia a la insulina |
| ROC | Curva ROC |
| SCD | Estearil-CoA desaturasa |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SOCS-3 | Isoforma 3 de la familia de proteínas supresoras de la señal de citoquinas |
| SREBP-1c | Proteína de unión al elemento regulador de esteroides |
| TG | Triglicéridos |
| TNFα | Factor de necrosis tumoral alfa |
| Tris | Tris (hidroximetil)-aminometano |
| VHB | Virus de la hepatitis B |
| VHC | Virus de la hepatitis C |
| VIH | Virus de la inmunodeficiencia humana |
| VLDL | Lipoproteínas de muy baja densidad |

RESUMEN

Introducción: La ácido graso translocasa CD36 facilita la captación y el transporte intracelular de los ácidos grasos de cadena larga en diversos tipos celulares. En modelos animales de esteatosis hepática, su expresión está aumentada en los hepatocitos, acompañándose su translocación a la membrana plasmática de un incremento en la incorporación hepatocelular de ácidos grasos. Se desconoce, por el contrario, el patrón de expresión de este transportador de ácidos grasos en el hígado de los pacientes con esteatosis de diferentes etiologías. Por otro lado, recientemente se han observado concentraciones elevadas de una fracción soluble de CD36 (CD36s) en pacientes con resistencia a la insulina y con hígado graso a nivel ecográfico, pero no existen evidencias fehacientes de su relación directa con el contenido de grasa intrahepática.

Objetivos: Caracterizar el patrón de expresión intrahepático de CD36 y evaluar la relación entre CD36s y esteatosis en pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) y en pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) con o sin esteatosis asociada.

Métodos: Se estudiaron en este trabajo de Tesis Doctoral un total de 314 pacientes, de los que 227 tenían EHGNA, 87 tenían hepatitis crónica por VHC, además de 85 pacientes con un hígado histológicamente normal (HN). En el estudio del perfil de expresión hepático de CD36 se incluyeron 130 pacientes, de los cuales 34 tenían esteatosis simple no alcohólica (ESNA), 30 esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), 66 hepatitis crónica por VHC y 32 HN. Se cuantificó la expresión hepática de CD36 por PCR a tiempo real y Western-blot, y se determinó la localización celular de CD36 mediante inmunohistoquímica en las biopsias hepáticas. Las concentraciones séricas de CD36s se cuantificaron, en todos los pacientes incluidos, mediante un ensayo de inmunoenzima comercial.

Resultados: En comparación con los sujetos con HN, los niveles de ARN mensajero y los de proteína de CD36 fueron significativamente mayores en los pacientes con ESNA (mediana: 0,84 veces mayor -rango 0,15-1,61- y mediana: 0,66 veces mayor -rango 0,33-1,06-, respectivamente); con EHNA (mediana: 0,91 veces mayor -0,22-1,81- y mediana: 0,81 veces mayor -0,38-0,92-, respectivamente); con hepatitis crónica por VHC sin esteatosis (mediana: 0,30 veces mayor -0,17-1,59- y mediana: 0,33 veces mayor -0,29-0,52-, respectivamente); y con hepatitis crónica por VHC con esteatosis (mediana: 0,85 veces mayor -0,15-1,98- y mediana: 0,87 veces mayor -0,52-1,26-, respectivamente). A diferencia de los individuos con HN, CD36 se expresaba predominantemente en la membrana plasmática de los hepatocitos en los pacientes con EHGNA y en los pacientes con hepatitis crónica por VHC con esteatosis asociada. Asimismo, se observó una correlación significativa entre el índice de expresión hepático de CD36 y las concentraciones de insulina en plasma, el índice de resistencia a la insulina (HOMA) y el grado histológico de esteatosis en los pacientes con EHNA ($r=0,663$, $r=0,735$ y $r=0,711$, respectivamente) y en los pacientes con hepatitis crónica por VHC con esteatosis ($r=0,723$, $r=0,769$ y $r=0,648$, respectivamente). Por otro lado, en los pacientes con EHGNA, los valores séricos de CD36s fueron significativamente más altos en los pacientes con ESNA que en aquellos con HN ($361,4 \pm 286,4$ vs $173,9 \pm 137,4$ pg/ml, respectivamente, $p<0,001$), pero no en los pacientes con EHNA ($229,6 \pm 202,5$ pg/ml; $p=0,153$). En la población de

pacientes con hepatitis crónica por VHC, las concentraciones séricas de CD36s fueron similares independientemente de la ausencia ($428,7 \pm 260,3$ pg/ml) o de la presencia de esteatosis ($387,2 \pm 283,6$ pg/ml, $p=0,173$). Encontramos un aumento significativo y progresivo en los valores séricos de CD36s en la cohorte de pacientes con EHGNA dependiendo del grado histológico de esteatosis ($p < 0,001$), pero no en los pacientes con hepatitis crónica por VHC ($p=0,151$). Analizando distintos modelos de regresión logística multivariante, se comprobó que las concentraciones séricas de CD36s se asociaban de manera independiente con la presencia de esteatosis avanzada en los pacientes con EHGNA tras el ajuste por variables demográficas y antropométricas [odds ratio (OR), 1,001; intervalo de confianza del 95% (IC), 1,000-1,002; $p=0,021$] y por variables metabólicas (OR, 1,002; IC del 95%, 1,000-1,003; $p=0,001$). Un dato interesante es que se observó una correlación significativa entre el índice de expresión de CD36 en el hígado y los valores de CD36s en el suero en toda la población de pacientes incluida en este trabajo de Tesis Doctoral ($r=0,499$, $p < 0,001$).

Conclusiones: El nivel de expresión hepático de la ácido graso translocasa CD36 se asocia significativamente con la hiperinsulinemia, el índice de resistencia a la insulina y el grado histológico de esteatosis en los pacientes con EHGNA y en los pacientes con hepatitis crónica por VHC con esteatosis asociada. Un hallazgo novedoso de este Trabajo de Tesis Doctoral es que CD36 se expresa fundamentalmente en la membrana plasmática de los hepatocitos en los pacientes con EHGNA y en los pacientes con hepatitis crónica por VHC con esteatosis concomitante. Por otro lado, las concentraciones séricas de CD36s están anormalmente elevadas en los pacientes con EHGNA y en los pacientes con hepatitis crónica por VHC con o sin esteatosis asociada. Los valores séricos de CD36s se asocian de manera independiente con la presencia de esteatosis avanzada en los pacientes con EHGNA pero no en los pacientes con hepatitis crónica por VHC. Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral sugieren que la inducción de la expresión y translocación de CD36 a la membrana plasmática de los hepatocitos puede ser determinante en la fisiopatología de la esteatosis hepática, tanto en la EHGNA como en la infección crónica por el VHC. Finalmente, los resultados de esta Tesis Doctoral también sugieren que la determinación de las concentraciones séricas de CD36s podría ser de utilidad, como marcador sérico de esteatosis avanzada, en la evaluación clínica de los pacientes con EHGNA.

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA

A pesar de que en 1958 ya se había descrito la presencia de esteatosis, inflamación y fibrosis en el hígado de individuos obesos y de operados con bypass intestinal, fue en 1980 cuando Ludwig y colaboradores (1) acuñaron el término "esteatohepatitis no alcohólica" (EHNA) para describir una serie de 20 pacientes, evaluados en la Clínica Mayo a lo largo de diez años, que tenían lesiones histológicas similares a las de los pacientes con hepatitis alcohólica pero sin historia de abuso de alcohol. Ludwig dividió a la EHNA en dos grupos: EHNA primaria asociada a la obesidad y EHNA secundaria a complicaciones de cirugía bariátrica, fármacos, o asociada a otros trastornos como la enfermedad de Wilson y la abetalipoproteinemia. Previamente, se habían propuesto otros términos para denominar a esta enfermedad hepática, como los de hepatitis pseudoalcohólica (2), hepatitis "alcohol-like" (3), hepatitis grasa (4, 5) y hepatitis diabética (6).

En la actualidad, la EHNA descrita por Ludwig se engloba dentro de la denominada "enfermedad hepática grasa no alcohólica" (EHGNA) que se caracteriza por un amplio espectro de lesiones histopatológicas en el hígado, que van desde la esteatosis simple (ESNA) hasta la EHNA con estadios variables de fibrosis que puede progresar hasta cirrosis e incluso hepatocarcinoma (7). La EHGNA es actualmente una de las causas más frecuentes de enfermedad hepática en nuestro entorno, conjuntamente con la hepatopatía alcohólica y la infección por el virus de la hepatitis C (VHC). La EHGNA ha adquirido mayor importancia en los últimos tiempos debido al cambio en el estilo de vida, en el que ha aumentado el aporte calórico de la dieta y han disminuido los hábitos de ejercicio, provocando un alarmante incremento de los casos de EHGNA en todo el mundo por lo que actualmente se considera a esta enfermedad metabólica del hígado la epidemia del siglo XXI (8).

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

Aunque la prevalencia de la EHGNA en la población general no se conoce con exactitud, fundamentalmente debido a que no se dispone de marcadores diagnósticos no invasivos que sean sensibles y específicos de esta enfermedad hepática, los datos provenientes de estudios poblacionales estiman su prevalencia entre un 20-30% de la población en los países occidentales y un 15% en los países asiáticos (9). La información disponible sobre la incidencia de la EHGNA es escasa, aunque en un estudio longitudinal prospectivo realizado en una población italiana se comprobó que la incidencia de hígado graso era de 18,5 casos por 1000 personas y año (10). Los datos sobre la prevalencia/ incidencia de la EHNA son muy variables y de difícil interpretación, ya que el diagnóstico de certeza sólo se puede realizar por biopsia hepática, estimándose su prevalencia en un 2-3% de la población general (11).

Numerosos estudios epidemiológicos han observado que la prevalencia de la EHGNA, tanto de la ESNA como de la EHNA, aumenta de manera directamente proporcional al índice de masa corporal (IMC), con cifras del 15% y del 3%, respectivamente, en personas no obesas; del 65% y del 20%, respectivamente, en personas obesas, y llegando hasta el 85% y el 40%, respectivamente, en pacientes con obesidad mórbida (12). Un hecho destacable es que esta estrecha asociación epidemiológica es mayor con la obesidad visceral o abdominal que con el IMC (12). La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es la segunda entidad que se asocia con mayor frecuencia con la EHGNA, alcanzando cifras de prevalencia del 70% en la población diabética (9). La dislipemia, fundamentalmente en forma de hipertrigliceridemia y/o bajas concentraciones séricas de colesterol HDL, es otra alteración metabólica que se observa frecuentemente en la EHGNA. Un aspecto relevante es que, incluso en ausencia de obesidad y de diabetes, los pacientes con EHGNA tienen una elevada prevalencia/incidencia de síndrome metabólico, hasta el punto que algunos autores sugieren que la EHGNA no es una consecuencia sino más bien un desencadenante del mismo (13).

Los datos epidemiológicos que indican que la prevalencia de la EHGNA en los Estados Unidos es mayor en la población hispana que en la caucásica y

en la afroamericana (13), así como que mutaciones puntuales (polimorfismos) de determinados genes, como el de la adiponutrina (14) o de la apolipoproteína C3 (15), aumentan el riesgo de EHGNA, sugieren que existen factores genéticos que predisponen a padecer esta enfermedad hepática. Tradicionalmente se ha considerado que la EHGNA es más frecuente en mujeres, pero estudios recientes indican que la EHNA concretamente es más prevalente en hombres (16). Tanto la prevalencia como la intensidad de la EHGNA aumenta con la edad. Así, los casos de EHNA con fibrosis avanzada y cirrosis son raros en adultos jóvenes mientras que son más frecuentes entre la 6ª y 8ª décadas de la vida (16). No obstante, la EHGNA no solo afecta a los adultos sino también a los niños. Distintos estudios epidemiológicos han encontrado signos ecográficos y analíticos de EHGNA en el 3% de la población pediátrica general, llegando al 53% en los niños obesos (9). El incremento que se está produciendo en la prevalencia de la obesidad, DM2 y síndrome metabólico, tanto en la población adulta como en la infantil de los países desarrollados, hace prever un notable incremento en la prevalencia de la EHGNA en los próximos años. En este sentido, un estudio prospectivo, recientemente publicado por Williams y cols. (17), ha encontrado una prevalencia de EHNA, diagnosticada por biopsia hepática, del 12,2% en una cohorte de adultos estadounidenses aparentemente sanos, sugiriendo los autores que alrededor de 2 millones de adultos en Estados Unidos podrían padecer una EHNA de manera asintomática. Este alarmante dato confirma que la EHNA, la forma clínica más progresiva de la EHGNA, está alcanzando una dimensión epidémica en los países desarrollados.

1.2. ETIOLOGÍA

La EHGNA se ha descrito en el contexto de diferentes asociaciones etiológicas, considerándose que representa el componente hepático del síndrome metabólico (12). Aunque no se conocen totalmente los mecanismos patogénicos y las bases moleculares de estas interacciones están aún poco definidas, la relación clínica entre los diferentes trastornos mencionados es evidente.

La obesidad es el trastorno metabólico más frecuentemente asociado a la EHGNA (18) y la probabilidad de padecerla aumenta con el grado de obesidad. Hasta el 60%-90% de las personas obesas presentan lesiones hepáticas que cubren todo el espectro histológico evolutivo de la EHGNA, siendo mayoritariamente del sexo femenino. Por otro lado, la mayoría de los casos de EHGNA se asocian con sobrepeso u obesidad. En el reciente estudio de Williams y cols. (17), el 64% de los individuos con esteatosis simple no alcohólica (ESNA) tenían un IMC ≥ 30 y el 80% de los sujetos con EHNA eran obesos. Existen datos epidemiológicos que asocian específicamente la obesidad troncular con una mayor predisposición para el desarrollo de diabetes y EHGNA (19). Sin embargo, existen datos epidemiológicos que sugieren que no todos los casos de EHGNA se asocian con obesidad; así, en la serie de Bacon y cols. (20), tan sólo el 39% de los pacientes eran obesos. Por el contrario, en un estudio histológico prospectivo muy reciente, García-Monzón y cols. observaron que el 77,6% de los individuos con ESNA y el 100% de aquellos con EHNA tenían sobrepeso u obesidad (21).

La DM2 es otra causa frecuente de EHGNA, ya que se detecta en el 34%-75% de los pacientes con EHGNA y casi siempre junto con obesidad (18). En un estudio de prevalencia en necropsias (22) se detectó obesidad y DM2 en 20 de 22 pacientes con EHGNA, especialmente pacientes con DM2 que habían requerido insulina. En la serie de adultos estadounidenses estudiada por Williams y cols. (17), el 22% de los diabéticos tenían EHNA mientras que García-Monzón y cols. encontraron que la prevalencia de EHNA entre los adultos españoles con DM2 fue del 13,3% (21).

Además de la obesidad y la DM2, la EHGNA puede aparecer en el contexto de otras co-morbilidades o trastornos menos frecuentes como la enfermedad de Weber-Christian (23), la abetalipoproteinemia (24), el síndrome del ovario poliquístico (25) y el síndrome de apnea/hipopnea obstructiva del sueño (26). Asimismo, determinados fármacos se han asociado con el desarrollo de lesiones hepáticas características de la EHGNA (27). En la Tabla 1 se resumen los potenciales factores etiológicos que se han asociado con la EHGNA.

Tabla 1. Etiología de la enfermedad hepática grasa no alcohólica

Síndrome metabólico

Obesidad

Diabetes mellitus tipo 2

Hipertrigliceridemia

Hipertensión arterial

Trastornos metabólicos adquiridos

Pérdida de peso intensa

Ayuno/dieta

Nutrición parenteral

Procedimientos quirúrgicos

Derivación intestinal

Resección extensa de intestino delgado

Gastroplastia

Trastornos metabólicos congénitos/hereditarios

Lipodistrofia

Glucogenosis

Hipo-/Abetalipoproteinemia

Homocistinuria

Tirosinemia

Enfermedad de Weber-Christian

Fármacos

Aminosalicilatos

Amiodarona

Cloroquina

Diltiazem

Espironolactona

Estrógenos

Glucocorticoides

Metotrexato

Sulfasalazina

Tamoxifeno

Terapia antirretroviral

Miscelanea

Síndrome de apnea obstructiva del sueño

Síndrome del ovario poliquístico

Diverticulosis intestinal con sobrecrecimiento bacteriano

Enfermedad celiaca

Enfermedad inflamatoria intestinal

Síndrome del aceite tóxico

1.3. PATOGENIA

En condiciones fisiológicas, la homeostasis lipídica requiere de la existencia de interacciones metabólicas coordinadas entre el hígado, el músculo y el tejido adiposo, ejercidas en gran medida por la acción reguladora de la insulina. Los ácidos grasos de los lípidos ingeridos se absorben y se reconstruyen en lípidos complejos envasados en quilomicrones. Estas lipoproteínas alcanzan la circulación sistémica a través de los vasos linfáticos más que por la vena porta y entregan los triglicéridos (TG) en el tejido adiposo para su almacenamiento. El hígado tiene un papel central en el metabolismo de los lípidos: capta los ácidos grasos libres (AGL) circulantes que proceden fundamentalmente del tejido adiposo y en menor medida de la absorción intestinal de la grasa de la dieta. Además, los hepatocitos pueden sintetizar los AGL de novo. Una vez en el hígado, los AGL tienen dos destinos fundamentales: incorporarse a las vías de oxidación intracelular para generar ATP o esterificarse para convertirse en TG y así secretarse a la sangre unidos a la apolipoproteína B100 y formar lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Por tanto, aquellos procesos que aumenten la captación hepática de AGL o alteren su metabolismo (síntesis, oxidación o esterificación) y su posterior secreción pueden producir un acúmulo de grasa en el hígado que se denomina esteatosis hepática.

1.3.1. Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina (RI) tiene un papel fundamental en la patogenia de la EHGNA (16). Se define como la condición en la cual existe incapacidad de las células de determinados tejidos (hígado, tejido adiposo y músculo como los principales) para metabolizar la glucosa, lo que estimula al páncreas para secretar y sintetizar más insulina, provocando aumento de los niveles circulantes de la misma (28).

La insulina, inhibe el metabolismo de los TG en el tejido adiposo, aumenta la síntesis intrahepática de AGL y de TG e inhibe la β -oxidación de los

AGL en los hepatocitos. En el tejido adiposo, la insulina frena la lipólisis de los TG almacenados al provocar la inactivación de la lipasa hormono-sensible (LHS), aumenta la entrada de glucosa y su oxidación glicolítica, activa a la lipoproteína lipasa (LPL) del endotelio vascular que actúa sobre los TG de los quilomicrones (QM) y de las lipoproteínas VLDL liberando los ácidos grasos que entran por difusión al adipocito (29). En el músculo esquelético y cardiaco, la insulina incrementa la entrada de glucosa al inducir la expresión de los transportadores GLUT4 en la membrana plasmática de las células musculares (30), activándose también su oxidación mediante la glicólisis y su almacenamiento en forma de glucógeno al tiempo que inhibe la β -oxidación de los AGL y la glucogenolisis. Por tanto, la insulina aumenta el contenido de grasa y la masa del tejido adiposo y el almacén de glucosa y ácidos grasos en el tejido muscular, a costa de reducir la glucemia y la lipemia postprandial. La insulina es lipogénica y antigluconeogénica en el hepatocito. La hiperinsulinemia y el aumento de la producción hepática de glucosa, que se producen como consecuencia de la RI, inducen la expresión de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c) y de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP), respectivamente, que a su vez activan la transcripción de la mayoría de los genes que participan en la síntesis hepática (de novo) de AGL (31).

La RI es un defecto temprano y crucial en la fisiopatología de la obesidad y la DM2 (32-34), así como del síndrome metabólico (35, 36). La etiología de la RI no se conoce completamente, pero actualmente se considera que la RI constituye el pilar patogénico central de la esteatosis hepática, ya que puede interferir el metabolismo hepático de los AGL a diferentes niveles (Figura 1). La RI produce un aumento del flujo de AGL al hígado debido al incremento de la hidrólisis de los TG del tejido adiposo por una activación mantenida de la LHS (37). De hecho, los pacientes con EHGNA tienen concentraciones séricas elevadas de AGL (38) y la mayoría (60%) del contenido hepático de TG proviene del pool circulante de los AGL, mientras que un 25% procede de la síntesis de novo de AGL y un 15% de la dieta (39).

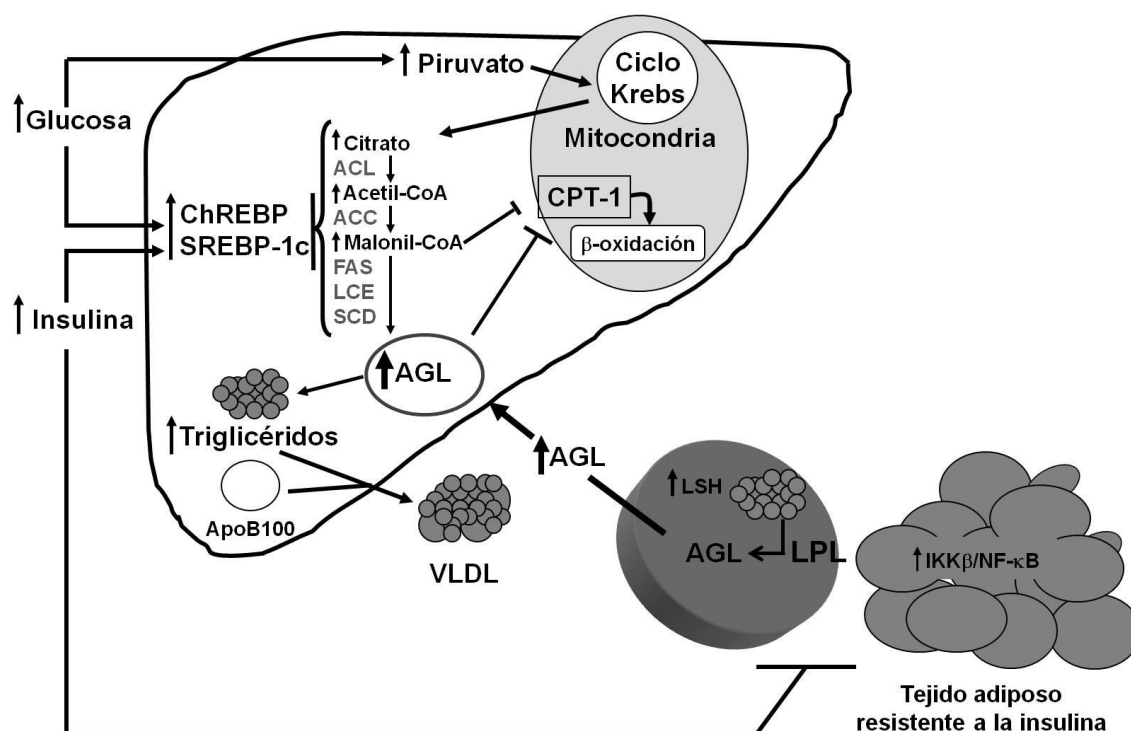


Figura 1. Fisiopatología de la esteatosis. Alteración de la homeostasis lipídica debido a la resistencia a la insulina a nivel del tejido adiposo. Modificada de Browning et al. J Clin Invest 2004 y Neuschwander-Tetri B. Hepatology 2010. ACC: acetil-CoA carboxilasa. ACL: ATP-citrato liasa. AGL: Ácidos grasos libres. ApoB100: apolipoproteína B100. ChREBP: Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos. CPT-I: carnitina palmitiltransferasa I. FAS: ácido graso sintetasa. IKK- β : Proteína kinasa de IK β . LCE: Elongasa de cadena larga. LHS: Lipasa hormono-sensible. LPL: Lipoproteína lipasa. NF- κ B: Factor nuclear de κ B. SCD: estearil-CoA desaturasa. SREBP-1c: Proteína de unión al elemento regulador de esteroides. VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

En un individuo con RI se produce un incremento de la concentración de AGL en el hepatocito ya que las tres principales fuentes de AGL están aumentadas: la dieta, la lipólisis del tejido adiposo y la síntesis de novo hepática (40). Además de una activa captación y entrada de los AGL procedentes del tejido adiposo y de la lipogénesis de novo (LDN), también se encuentra incrementada la captación de AGL en los sinusoides hepáticos por la acción de la lipasa hepática (LH) sobre las lipoproteínas enriquecidas en TG (41). Como la acumulación de AGL es citotóxica, los hepatocitos los procesan incorporándolos en lípidos complejos y oxidándolos en mitocondrias y peroxisomas (β -oxidación) y en el retículo endoplasmático (ω -oxidación) (42, 43). En la EHGNA, la principal vía oxidativa de los AGL, la β -oxidación mitocondrial, está disminuida (44) por lo que se produce un aumento del flujo

de AGL hacia su esterificación en TG, contribuyendo así al desarrollo de la esteatosis hepática.

1.3.2. Resistencia a la insulina y hepatitis C

Se ha demostrado la capacidad del VHC para promover el desarrollo de RI y diabetes (45). De hecho, la DM2 es más frecuente en pacientes con hepatitis C (20-25%) que en otras hepatopatías crónicas (hepatitis B: 10%), independientemente del estadio histológico (46).

El mecanismo por el que el VHC induce RI no está bien establecido. Se ha demostrado que el VHC puede promover la aparición de RI en el hígado incrementando la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y del supresor de citoquinas 3 (SOCS-3), mediadores que inhiben la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa y la fosforilación de IRS-1 y 2, respectivamente, lo que se traduce en una disminución de la fosforilación de la protein-quinasa Akt (47).

La importancia de la RI en la infección crónica por el VHC se desprende de estudios epidemiológicos donde se ha correlacionado la presencia de RI, medida por modelos homeostáticos, con una mayor progresión de la fibrosis hepática, probablemente por generar un estado inflamatorio que acelera la progresión de la fibrosis (48). Entre otros factores implicados en la progresión de la fibrosis en pacientes con hepatitis C y RI están: a) la hipoadiponectinemia b) la hiperleptinemia y c) el incremento de los niveles de TNF α . La edad en el momento de la infección, la cifra de transaminasas y el sobrepeso son factores independientes asociados con la progresión rápida de la fibrosis (49). En pacientes con fibrosis avanzada, un incremento del peso de más del 5% en el primer año se asoció a un mayor riesgo de desarrollo de complicaciones (hemorragia por varices, encefalopatía o ascitis) (50).

1.3.3. Esteatosis

El equilibrio entre la captación/síntesis de TG y la hidrólisis/secreción de TG es crítico en el mantenimiento de la homeostasis de los lípidos en el hígado. La perturbación de cualquiera de estas vías podría ser perjudicial para el metabolismo de los lípidos. En el caso de la EHNA, la esteatosis hepática se puede producir como consecuencia del aumento de la captación hepática de AGL procedentes del tejido adiposo o de la dieta, por un incremento de la LDN que conlleva un aumento de la síntesis de TG, por una disminución de los mecanismos oxidativos de los AGL en el hepatocito o por una disminución en la secreción hepática de las lipoproteínas VLDL enriquecidas en TG.

1.3.3.1. Aumento de la lipólisis periférica y de la lipogénesis de novo

Existen estudios que sugieren que la esteatosis hepática se produciría como consecuencia de un incremento del flujo y de la captación hepática de AGL circulantes procedentes de una lipólisis excesiva en el tejido adiposo resistente a la insulina. En este sentido, Donnelly y cols. (39) demostraron que en pacientes con EHNA la mayoría de los AGL intrahepáticos provenían de la lipólisis del tejido adiposo, mientras que solo el 25% provenía de la LDN. Por el contrario, Lambert y cols. (51) han demostrado recientemente que la LDN era más de 3 veces superior en los pacientes con un alto contenido en grasa intrahepática, determinada por resonancia magnética, que en los individuos con un hígado con bajo contenido en grasa, mientras que el contenido hepático de AGL procedentes de la lipólisis del tejido adiposo fue similar en ambos grupos. Es probable, no obstante, que ambos mecanismos, el aumento de la captación hepática de AGL procedentes del tejido adiposo y el incremento de la LDN, jueguen un papel sinérgico en la patogenia de la esteatosis hepática.

1.3.3.2. Disminución de la autofagia

La autofagia es un proceso intracelular crucial para la homeostasis celular y que consiste en la degradación lisosomal de proteínas y organelas

senescentes así como de gotas lipídicas. Existen evidencias experimentales recientes de que la autofagia está disminuida en los hepatocitos de modelos animales de EHGNA (52) así como también en los hepatocitos de pacientes con EHGNA (53).

La demostración in vitro y en modelos animales de EHGNA de que la alteración del flujo autofágico produce una acumulación de grasa en el citoplasma de los hepatocitos y que la activación farmacológica del flujo autofágico mejora la esteatosis y la lesión hepática (52-54), indica que la disminución de la autofagia podría ser uno de los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la esteatosis hepática.

1.3.3.3. Disfunción mitocondrial

La β -oxidación mitocondrial es el principal destino oxidativo de los AGL. En el contexto de la EHGNA, la β -oxidación mitocondrial se acelera como un mecanismo de compensación que trata de evitar el excesivo acúmulo de grasa en los hepatocitos. Desgraciadamente, este incremento de la β -oxidación mitocondrial es insuficiente y se acompaña de una disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) que da lugar a un aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno y a la activación de las vías proinflamatorias. Actualmente se considera que durante la evolución de la EHGNA se produce una reducción progresiva de la actividad de la CRM que produciría estrés oxidativo y daño hepatocelular (55).

1.3.3.4. Alteración de la secreción hepática de triglicéridos

El hígado secreta los triglicéridos al torrente sanguíneo formando parte de las lipoproteínas VLDL. Este es un proceso altamente regulado y que depende del nivel de triglicéridos en el hígado, de la suficiente disponibilidad de apoproteína B100 y de la correcta actividad de la proteína de transferencia microsomal de TG (MTP) que juega un papel clave en el adecuado ensamblaje de las lipoproteínas VLDL enriquecidas en TG que posteriormente serán excretadas (56). En los pacientes con EHGNA se ha demostrado que la secreción de VLDL está aumentada y es responsable en gran medida de la hipertrigliceridemia que caracteriza a estos pacientes (57). Por el contrario, Ota

y cols. (58) han demostrado que la secreción de apoproteína B100 está disminuida en modelos animales de EHGNA, lo que contribuiría a una disminución de la secreción hepática de TG favoreciendo por tanto el acúmulo de grasa en los hepatocitos.

En resumen, aunque la disminución de la autofagia y la disfunción mitocondrial así como la alteración de la secreción hepática de TG pueden contribuir al acúmulo de grasa en el hígado, hoy en día se considera que el incremento del flujo y de la captación hepática de AGL circulantes procedentes de una lipólisis periférica excesiva, todo ello como consecuencia de la resistencia periférica a la insulina, y el incremento de la LDN en el hígado son los principales mecanismos fisiopatológicos que contribuyen a la esteatosis hepática (Figura 1).

1.3.4. Esteatosis y hepatitis C

La esteatosis hepática es el hallazgo histopatológico que se observa con mayor frecuencia en la infección crónica por el VHC que en la infección por el virus de la hepatitis B (VHB). Los principales factores asociados con esteatosis en la infección crónica por el VHC son: factores víricos (el genotipo 3), factores del huésped (consumo de alcohol, sobrepeso, hiperlipidemia, diabetes, RI) y terapia (corticoides, metotrexato). Con respecto a los factores víricos, tanto la proteína core como la NS5A alteran el metabolismo lipídico en cultivos celulares y estimulan la formación de gotas lipídicas.

Existen estudios clínicos transversales que sugieren que tanto la esteatosis como la RI se asocian con una mayor progresión de la lesión hepática y de la fibrosis en pacientes con hepatitis crónica C (59). No obstante, la relación causal entre el grado de esteatosis y el estadio fibrótico se debe demostrar adecuadamente en estudios clínicos longitudinales, analizando biopsias hepáticas pareadas, en grandes cohortes de pacientes con hepatitis crónica C.

1.3.5. Esteatohepatitis

Aun no están bien definidos los mecanismos moleculares implicados en la progresión de ESNA a EHNA, pero en los últimos años se ha incrementado notablemente nuestro conocimiento del efecto deletéreo en los hepatocitos de los metabolitos derivados de los AGL, lo que ha llevado a revisar el modelo patogénico anterior (60) y proponer una teoría patogénica alternativa denominada “teoría de la lipotoxicidad” (61). Se conocen numerosos metabolitos potencialmente tóxicos para el hepatocito, pero un estudio reciente ha identificado a la lisofosfatidilcolina como un importante mediador de la EHNA en ratones (62). Dado que la mayoría de la evidencia científica que sustenta esta teoría proviene de estudios en modelos animales, aún debemos esperar a los resultados de los estudios que se están realizando en hepatocitos humanos y en pacientes con EHNA, utilizando técnicas de lipidómica, con el objeto de validar si el daño hepático lipotóxico mediado por los metabolitos de los AGL juega un papel preponderante en la patogenia de la EHNA en humanos.

La adiponectina y el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) son las adipoquinas más implicadas en la patogenia de la EHNA. Se ha descrito que la adiponectina es una hormona anti-esteatósica que promueve la β -oxidación mitocondrial de los AGL y además posee un efecto anti-inflamatorio, probablemente debido a su capacidad para inhibir la síntesis y la secreción de $\text{TNF}\alpha$. Curiosamente, estas dos adipoquinas se regulan mutuamente su actividad biológica. $\text{TNF}\alpha$ inhibe la síntesis y la actividad de adiponectina y esta inhibe la síntesis y la actividad de $\text{TNF}\alpha$. Estudios en modelos animales de EHNA han demostrado que la relación $\text{TNF}\alpha$ alto/adiponectina baja promovía la EHNA en ratones (63). También se ha comprobado que las concentraciones séricas de adiponectina son significativamente más bajas en los pacientes con EHNA que en aquellos con ESNA (64). Sobre la base de estos datos clínicos y experimentales, tanto en humanos como en ratones, el desequilibrio entre $\text{TNF}\alpha$ y adiponectina parece desempeñar un papel importante en la progresión de ESNA a EHNA.

El papel del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en la patogenia de la EHNA se encuentra bien establecido y su relación con el avance de la enfermedad es directamente proporcional (65).

El estrés del retículo endoplásmico es una alteración potencialmente asociada con la patogenia de la EHNA ya que es capaz de inducir la activación de diferentes vías proinflamatorias intracelulares que, a su vez, estarían implicadas en la insulinoresistencia, la inflamación, la apoptosis y la disfunción mitocondrial que caracteriza a la EHNA (66).

El desequilibrio de la microbiota, conjuntamente con un aumento de la permeabilidad intestinal, es otro potencial mecanismo patogénico de la EHNA que ha adquirido recientemente un gran interés científico (67). Esta alteración de la microbiota intestinal produce un incremento de la producción intestinal de etanol y la liberación de endotoxinas bacterianas que activan la producción de citoquinas proinflamatorias por las células de Kupffer, contribuyendo a la inflamación hepática (68, 69).

En resumen, además de que el estrés oxidativo y la disbiosis intestinal podrían jugar un importante papel en la patogenia de la EHNA, el descubrimiento de que el tejido adiposo está sometido a un estado de inflamación crónica y se comporta como un órgano endocrino capaz de secretar adipocinas, ha permitido establecer un nexo de unión entre las alteraciones metabólicas que conducen al acúmulo en el hígado de AGL y TG y la inflamación hepática, reforzando el papel de la lipotoxicidad hepatocelular en la patogenia de la EHNA (Figura 2).

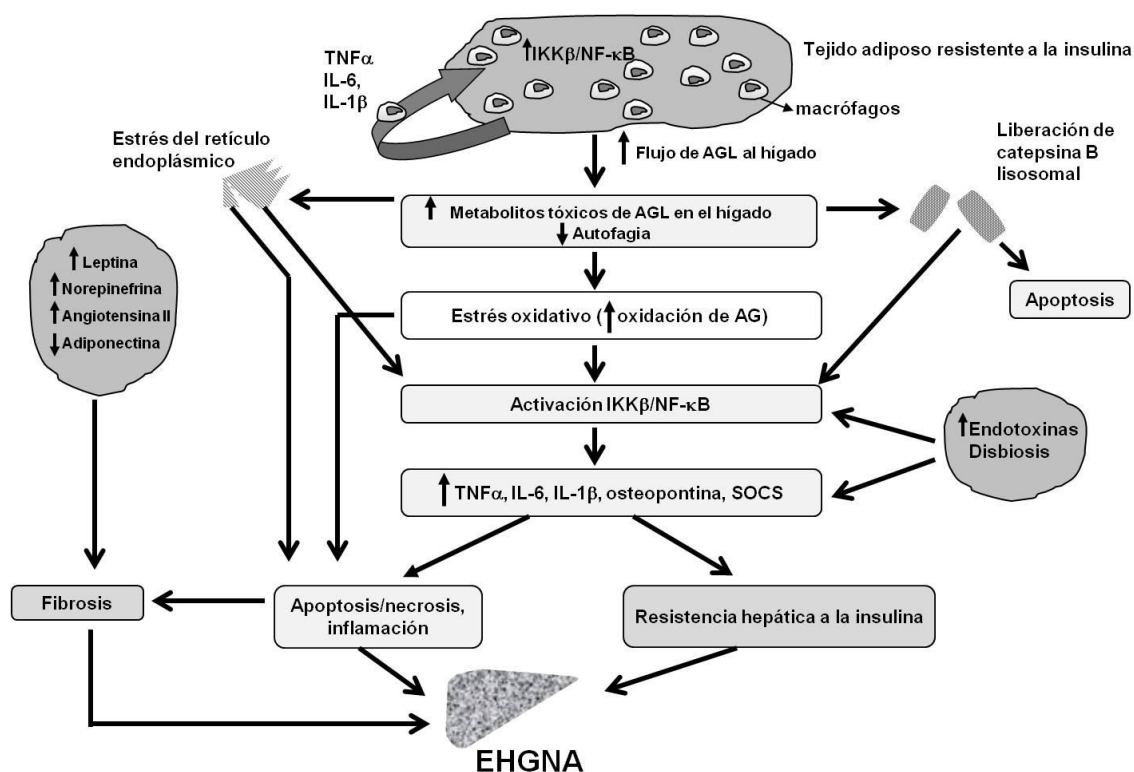


Figura 2. Mecanismos patogénicos de la EHGNA. Modificada de Day CP, Gastroenterology 2006 y Neuschwander-Tetri B, Hepatology 2010. AGL: Ácidos grasos libres. IKK-β: Proteína kinasa de IKβ. IL-6: Interleucina 6. IL-1β: Interleucina 1β. SOCS: proteínas supresoras de la señal de citoquinas. TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa

1.4. HISTORIA NATURAL

La EHGNA es una enfermedad habitualmente asintomática. Bacon y cols. encontraron algún síntoma previo al diagnóstico de la enfermedad en un 25% de sus pacientes. En la exploración física, el hallazgo más frecuente es la hepatomegalia, que aparece en un 75% de los pacientes (20).

Aunque tradicionalmente se ha considerado que la EHGNA es una enfermedad hepática de pronóstico benigno, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que los pacientes con EHGNA tienen una tasa de supervivencia significativamente más baja que la población general, especialmente aquellos con EHGNA y fibrosis significativa. Las causas de muerte más frecuentes en la EHGNA son la enfermedad cardiovascular y la enfermedad hepática avanzada (70-73).

La evolución de la EHGNA depende del estadio histológico de la enfermedad hepática. Aproximadamente 10 a 40% de los pacientes con ESNA progresarán a EHNA en un periodo de 8 a 13 años. Alrededor del 15% de los pacientes con EHNA y un estadio de fibrosis ≤ 2 progresarán a cirrosis en un periodo de tiempo similar, incrementándose hasta el 25% en los casos de EHNA con estadio fibrótico 3. Un 7% de los pacientes con EHNA en estadio cirrótico pueden desarrollar un hepatocarcinoma en 10 años, y alrededor del 50% necesitarán un trasplante hepático o morirán por complicaciones de su enfermedad hepática (70-72).

1.5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la EHGNA debe sospecharse en los pacientes que no consumen alcohol (menos de 3 bebidas alcohólicas al día en hombres y menos de 2 al día en mujeres) y presentan algún factor de riesgo, especialmente obesidad y DM2, con una elevación persistente y moderada de las transaminasas de causa no aclarada o que presentan una hepatomegalia aislada (74).

La historia clínica, las pruebas de laboratorio y algunas pruebas de imagen ayudan a seleccionar aquellos casos que pueden beneficiarse de una biopsia hepática, única prueba que permite efectuar un diagnóstico de certeza y establecer un pronóstico con mayor fiabilidad.

1.5.1. Pruebas de laboratorio

No existe ningún dato de laboratorio específico de EHGNA. El dato más constante es una hipertransaminasemia leve-moderada, aunque el nivel de elevación de transaminasas no se correlaciona con la severidad de la enfermedad, puesto que no diferencia entre ESNA y/o EHNA. Con menor frecuencia existe una elevación de gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT) y fosfatasa alcalina. Los pacientes con EHGNA también pueden tener las concentraciones séricas de las enzimas hepáticas dentro de los límites

normales, independientemente de si se trata de una esteatosis simple o una esteatohepatitis (9). Los pacientes con cirrosis pueden presentar elevación de las transaminasas y de la bilirrubina así como un descenso de la albúmina, del tiempo de protrombina y de las plaquetas.

Es frecuente encontrar alteraciones bioquímicas que se relacionan con las comorbilidades que se asocian con la EHGNA, particularmente la obesidad y la DM2, con alteración de los lípidos séricos (hipertrigliceridemia y descenso de los valores de colesterol HDL), hiperglucemia e hiperinsulinemia. La ferritina sérica puede estar elevada en los pacientes con EHGNA, por lo que en estos casos se debe analizar la saturación de transferrina y, si está anormalmente aumentada, realizar el genotipado del gen de la hemocromatosis hereditaria (9, 75).

Dado que la EHGNA puede coexistir con otras enfermedades crónicas hepáticas, es necesario descartarlas mediante determinaciones bioquímicas e inmunoserológicas que incluyan marcadores víricos, autoanticuerpos, cupremia, cupruria y ceruloplasmina, alfa-1-antitripsina, hormonas tiroideas y anticuerpos antiendomisio o antitransglutaminasa. También debe descartarse de manera cuidadosa el consumo de fármacos potencialmente hepatotóxicos.

1.5.2. Pruebas de imagen

Tanto la ecografía, como la tomografía computarizada y la resonancia magnética son técnicas que permiten observar con facilidad la existencia de un depósito aumentado de grasa en el hígado. Sin embargo, estas pruebas de imagen no permiten diferenciar la ESNA de la EHNA con o sin fibrosis.

La ecografía es la técnica más asequible y económica siendo la técnica a utilizar en primer lugar. El criterio diagnóstico fundamental de la esteatosis es la hiperecogenicidad del parénquima hepático, con un patrón de ecos finos. El grado de esteatosis se valora por el descenso de la amplitud de los ecos en profundidad, por el incremento de la diferencia en la amplitud de los ecos entre el parénquima hepático y el renal y por la pérdida de ecos de las paredes de las ramas venosas portales (76, 77).

Aunque el depósito de grasa en el hígado suele ser difuso, en ocasiones la esteatosis puede ser focal y dar falsas imágenes sugestivas de lesiones nodulares. En estos casos, la tomografía computarizada y la resonancia magnética pueden ser de utilidad. En fases avanzadas de la enfermedad, las pruebas de imagen también pueden mostrar cambios sugestivos de cirrosis o signos de hipertensión portal.

Existen nuevas pruebas de imagen como la espectroscopia protónica por resonancia magnética y la elastografía transitoria que parecen muy prometedoras para la valoración de la esteatosis y de la fibrosis, respectivamente, pero aún necesitan ser validadas mediante estudios clínicos en grandes poblaciones de pacientes antes de su implementación en la práctica clínica (9, 78).

1.5.3. Biopsia hepática

La principal característica histológica de la EHGNA es el acúmulo de grasa en los hepatocitos, fundamentalmente triglicéridos, lo que se denomina esteatosis. La presencia de más de un 5% de hepatocitos esteatósicos es el criterio mínimo para el diagnóstico histológico de esteatosis hepática (7).

La esteatosis en la EHGNA es generalmente macrovesicular, caracterizada por la presencia de grandes gotas de grasa en el interior de los hepatocitos que desplaza el núcleo a la periferia. No es infrecuente la presencia combinada de esteatosis macro y microvesicular. En la esteatosis simple puede observarse un leve infiltrado inflamatorio lobulillar y/o portal, sin que existan signos de daño hepatocelular ni fibrosis. La extensión de la esteatosis se evalúa semicuantitativamente, dividiendo al lobulillo en tercios y diferenciando un grado 1 o esteatosis leve cuando el porcentaje de hepatocitos esteatósicos oscila entre el 6 y el 32%; grado 2 o esteatosis moderada, del 33 al 66%, y grado 3 o esteatosis intensa cuando ocupa más del 66% del lobulillo hepático (7).

Los criterios para el diagnóstico histológico de esteatohepatitis son la presencia de esteatosis, daño hepatocelular (degeneración balonizante,

apoptosis o necrosis), e infiltración inflamatoria lobulillar. La presencia de fibrosis es frecuente en la esteatohepatitis, pero no es un requisito necesario para el diagnóstico histológico (7). Típicamente, la fibrosis en la esteatohepatitis comienza en la zona 3 del lobulillo hepático (región central o perivenular) adquiriendo un patrón pericelular y perisinusoidal. La fibrosis puede progresar hasta formar puentes porto-portales o veno-portales, desestructurando la arquitectura lobulillar hasta configurar la cirrosis.

Se han descrito diferentes sistemas para la clasificación de la EHNA de acuerdo con las lesiones histológicas. El sistema propuesto por Brunt y cols. (79) establece la actividad o grado según la intensidad del daño hepatocelular y de la inflamación, y el estadio según la intensidad de la fibrosis. La EHNA grado 1 o leve presenta esteatosis, degeneración balonizante o abalonamiento ocasional de los hepatocitos y ligera inflamación portal o lobulillar. El grado 2 o moderado se caracteriza por esteatosis más marcada, abalonamiento evidente e infiltrados inflamatorios más intensos que el grado 1. La EHNA grado 3 o intensa presenta esteatosis importante, abalonamiento e inflamación, tanto lobulillar como portal. En relación con la fibrosis, el estadio 1 incluiría la fibrosis perisinusoidal, especialmente centrolobulillar; el estadio 2, la fibrosis perisinusoidal y portal; el estadio 3, igual que la anterior más puentes de fibrosis, y el estadio 4, cirrosis.

El índice de actividad histológica de la EHNA más utilizado actualmente es el descrito por Kleiner y cols. (80) que está basado en la evaluación y puntuación semicuantitativa de cuatro parámetros histopatológicos: grado de esteatosis (de 0 a 3), grado de inflamación lobulillar (de 0 a 3), grado de balonización de los hepatocitos (de 0 a 2) y estadio de fibrosis (de 0 a 4), que permite diferenciar de manera adecuada a los casos con EHNA definida (puntuación ≥ 5) de aquellos sin EHNA (puntuación < 3) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las lesiones histológicas en EHGNA

| |
|---|
| NAFLD Índice actividad NAS (0-8) |
| Esteatosis (0-3) |
| Inflamación lobulillar (0-3) |
| Balonización (0-2) |
| Fibrosis (0-4) |
| 0: Ausencia de fibrosis |
| 1: Fibrosis zona 3, fibrosis perisinusoidal, fibrosis portal/peripoportal |
| 2: Fibrosis perisinusoidal y fibrosis portal/peripoportal |
| 3: Fibrosis en puentes |
| 4: Cirrosis |

1.5.4. Marcadores no invasivos de fibrosis hepática

El examen histológico de la biopsia hepática es actualmente el método más fiable para diferenciar la ESNA de la EHNA, y la principal indicación para realizar la biopsia hepática es conocer el estadio fibrótico de la enfermedad, ya que diferentes estadios fibróticos condicionan pronósticos distintos y diferentes estrategias terapéuticas (9).

Los costes y riesgos de realizar una biopsia hepática han impulsado el desarrollo de diferentes métodos no invasivos séricos para evaluar la EHGNA (81). El índice “NAFLD fibrosis score” incluye 6 variables (edad, IMC, relación AST/ALT, plaquetas, albúmina y presencia/ausencia de diabetes y/o hiperglucemia) y puede predecir con bastante fiabilidad la presencia de fibrosis avanzada (estadios 3 y 4) (82). El índice ELF (Enhanced Liver Fibrosis) incluye 3 marcadores directos de fibrosis: el inhibidor de la metaloproteinasa-1, el ácido hialurónico y el procolágeno tipo III (83). Los autores encontraron que el índice ELF mostraba una excelente eficacia para el diagnóstico de fibrosis avanzada (estadios 3-4), una buena eficacia para el diagnóstico de fibrosis moderada (estadios 1-2) y aceptable para la ausencia de fibrosis. Los autores observaron que la eficacia del índice ELF mejoraba significativamente cuando se utilizaba conjuntamente con el índice NAFLD fibrosis score, demostrando además que el

índice ELF, sólo o combinado con el NAFLD fibrosis score, podría disminuir un 82% y un 88%, respectivamente, las biopsias hepáticas (84). El índice BARD se basa en la suma de 3 variables predefinidas: IMC ≥ 28 (1 punto), AST/ALT $\geq 0,8$ (2 puntos) y diabetes o índice HOMA $> 6,2$ (1 punto). Una puntuación superior a 2 del índice BARD mostraba una buena eficacia para el diagnóstico de fibrosis avanzada (estadios 3-4), con un valor predictivo positivo del 43% y negativo del 96% (85). El Fibrotest es un algoritmo matemático basado en una combinación de parámetros bioquímicos que se ha mostrado eficaz como predictor de fibrosis avanzada en pacientes con EHGNA (86).

La elastografía de transición (Fibroscan[®]) mide la rigidez hepática y puede detectar estadios avanzados de fibrosis, pero la técnica es a menudo poco fiable en los pacientes con EHGNA y obesidad. Además, Fibroscan[®] no es superior a los índices serológicos para predecir la severidad de la fibrosis hepática en la EHNA (87).

1.6. TRATAMIENTO

No se dispone de una estrategia bien establecida en el tratamiento de la EHGNA debido a la escasa expresividad clínica y progresión variable. No hay una terapéutica estándar ni se conoce el momento más oportuno para su inicio o finalización. Se han ensayado múltiples fármacos en los pacientes con EHNA. En la actualidad los fármacos más prometedores son los que mejoran la resistencia a la insulina, como la metformina y las tiazolidindionas o glitazonas, y los antioxidantes, fundamentalmente la vitamina E.

1.6.1. Medidas generales

La EHGNA es, en la mayoría de los casos, una manifestación de la obesidad y el síndrome metabólico, por lo que la primera medida terapéutica deberá ir dirigida a mejorar las enfermedades asociadas, como la obesidad y la diabetes, y corregir las alteraciones que caracterizan al síndrome metabólico y que contribuyen a la patogenia de la EHNA, como la RI. La principal

recomendación a los pacientes con EHNA que sean obesos o con sobrepeso es la adopción de hábitos de vida más saludables, consistentes en disminuir la ingesta calórica y aumentar el ejercicio físico, con el objeto de conseguir una pérdida de peso gradual y progresiva al tiempo que sostenible. La reducción del peso corporal se ha asociado con una menor hiperglucemia y RI, junto con descenso en las transaminasas y mejoría de la histología hepática (esteatosis y fibrosis) (88). El objetivo a conseguir debe ser una pérdida de peso de 0,5-1 kg/semana y un descenso del 5-10% del peso corporal en un periodo entre 6 y 12 meses, con el fin de mantenerlo (89). Lo ideal es que estos pacientes pierdan entre el 7% y el 10% de su peso en un periodo de entre 6 y 12 meses, como consecuencia de una dieta con un bajo contenido en glucosa y fructosa así como de grasas saturadas, y un ejercicio aeróbico moderado y regular (un mínimo de 5 sesiones semanales de 45 minutos de duración) (74). Se deben evitar los periodos de ayuno prolongado y las pérdidas de peso rápidas mediante dietas muy estrictas ya que en esta situación se produce una movilización de ácidos grasos del tejido adiposo al hígado, el cual también se ve privado de un aporte correcto de proteínas y de otros nutrientes esenciales, agravando la esteatosis y empeorando las lesiones histológicas preexistentes.

Un meta-análisis sobre los diferentes ensayos clínicos terapéuticos aleatorizados ha demostrado que la reducción del peso corporal es, hasta el momento, la única medida eficaz y sin efectos secundarios para mejorar la EHNA, aunque hasta el 50% de los pacientes no fue capaz de conseguir la reducción ponderal marcada (90).

Existen fármacos para conseguir una reducción del peso corporal, indicados en obesos con índice de masa corporal $> 30 \text{ kg/m}^2$ sin respuesta a las medidas para reducción de peso (dieta y ejercicio). El orlistat es un fármaco que actúa bloqueando la lipasa intestinal provocando una malabsorción de grasas (con los consiguientes posibles efectos secundarios). Existen ensayos con un pequeño número de pacientes con EHNA tratados con orlistat durante 6 meses en los que se consiguió una disminución del peso corporal y de la RI, así como de la histología hepática (inflamación y fibrosis). La sibutramina es un inhibidor de la recaptación de serotonina, noradrenalina y dopamina que aumenta la saciedad y disminuye el apetito a nivel central, que se ha

comparado con el orlistat, encontrándose unos efectos similares en cuanto a reducción de peso, RI y esteatosis hepática (91).

La cirugía bariátrica se ha asociado con una evidente mejoría de las lesiones histológicas típicas de la EHNA, incluida la fibrosis (74). En la práctica actual, la técnica quirúrgica más utilizada es el bypass gástrico en Y de Roux, y su indicación se restringe a los pacientes con obesidad mórbida y EHNA con fibrosis avanzada que no consiguen disminuir de peso con medidas dietéticas y farmacológicas (92).

1.6.2. Tratamiento de la resistencia a insulina

La metformina es una biguanida que actúa mejorando la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo y muscular, disminuyendo la producción de glucosa hepática, inhibe la expresión de enzimas lipogénicas y aumenta la β -oxidación mitocondrial.

Se han realizado numerosos estudios clínicos que han evaluado la eficacia de la metformina en el tratamiento de la EHNA, básicamente en pacientes no diabéticos, obteniendo resultados contradictorios; pero en un reciente meta-análisis se ha comprobado que la metformina mejora la bioquímica hepática y el grado de esteatosis sin mostrar efectos significativos sobre la inflamación y la fibrosis hepática. Estos resultados, no obstante, no permiten extraer conclusiones definitivas, ya que el número de pacientes tratados con metformina en estudios clínicos controlados es bajo, por lo que aún no puede recomendarse en el tratamiento de la EHNA (93).

Las glitazonas (rosiglitazona y pioglitazona) actúan a través de la activación del receptor nuclear PPAR γ , potenciando el efecto de la insulina e incrementando la utilización periférica de la glucosa. El receptor PPAR- γ se encuentra principalmente en el tejido adiposo, donde potencia la lipogénesis y secuestra los AGL, aumentando también la adiponectina. Un meta-análisis (94) concluye que el tratamiento de la EHNA con glitazonas, conlleva una mejoría histológica y bioquímica significativa, especialmente en pacientes no diabéticos.

1.6.3. Tratamiento del estrés oxidativo

La importancia del estrés oxidativo en la patogenia de la EHNA justifica el ensayo de antioxidantes, como la vitamina E, en el tratamiento de esta enfermedad. Los suplementos orales diarios de vitamina E durante 6 meses han mejorado la bioquímica y la histología hepática en pacientes con EHNA. Sin embargo, no puede recomendarse su uso extensivo dado que un exceso de esta vitamina se asocia a un aumento de la mortalidad global (95).

Existe un ensayo clínico aleatorizado para evaluar la eficacia y la seguridad del tratamiento con pioglitazona, vitamina E y placebo. Ambos fármacos mejoraron la bioquímica hepática y también la histología (esteatosis y balonización hepatocelular), sin disminución significativa de la fibrosis ni de la inflamación lobulillar con ninguno de los dos fármacos (96). Aunque los resultados de este estudio apoyan la eficacia de la vitamina E y nos aportan nuevas posibilidades en el tratamiento en la EHNA, no aportan evidencias suficientemente fuertes.

1.6.4. Tratamiento hipolipemiante

Se han realizado estudios con varios fármacos hipolipemiantes debido a la alteración lipídica característica de los pacientes con EHGNA y síndrome metabólico. Hay varios estudios que han confirmado la eficacia y seguridad de las estatinas en la EHGNA. Se han realizado estudios con pravastatina y atorvastatina con una mejoría de las transaminasas, del perfil lipídico y de la histología hepática (97, 98). En un estudio de seguimiento histopatológico a largo plazo (más de 10 años) en pacientes con EHGNA y alteración persistente de transaminasas se demostró una reducción significativa de la esteatosis en el grupo que recibía tratamiento con estatinas (99).

1.6.5. Otros tratamientos

La pentoxifilina es un fármaco capaz de inhibir de forma inespecífica la producción de $\text{TNF}\alpha$, modificando la contribución de esta citoquina en la EHGNA. Un reciente meta-análisis refiere que produce disminución significativa en el peso corporal, transaminasas y glucosa con reducción de la puntuación de actividad EHGNA y mejora de la inflamación lobular. No eran evidentes la mejora en el grado de esteatosis y fibrosis (100).

Los probióticos son compuestos que contienen microorganismos vivos con capacidad inmunomoduladora a través de su interacción con el epitelio intestinal. Existe un interés creciente en los mecanismos que conectan la microbiota con la EHNA. La manipulación de la microbiota a través de los probióticos, prebióticos y antibióticos obtienen resultados alentadores para el tratamiento de la obesidad, la diabetes, y la EHNA (101).

El trasplante hepático es una opción terapéutica que debe considerarse en los pacientes con EHNA en fase de cirrosis avanzada con aparición de complicaciones y/o de hepatocarcinoma, al igual que en el resto de hepatopatías crónicas. Los resultados a medio plazo de estos pacientes son buenos, aunque a medio plazo pueden reaparecer las lesiones histológicas características de la EHNA.

2. MECANISMOS DE CAPTACIÓN CELULAR DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES

Se sabe que los AGL acceden al interior de las células por difusión pasiva y mediante mecanismos mediados por proteínas que funcionan como transportadores de ácidos grasos, tales como la familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs), la proteína receptora de ácidos grasos asociada a la membrana plasmática (FABPpm), la caveolina-1 y la ácido graso translocasa CD36 (CD36) de la cual se hablará en detalle más adelante (102).

La entrada de los AGL al interior de la célula se ha considerado durante mucho tiempo que se produce por difusión pasiva simple, en la que la tasa de internalización está determinada principalmente por la concentración extracelular de AGL y la tasa de metabolismo intracelular de AGL. Se ha demostrado que los cambios agudos en la internalización celular de AGL en respuesta a los estímulos mecánicos (contracción muscular) y hormonales (insulina) están regulados por proteínas de membrana específicas, de una manera similar a la regulación de la captación de glucosa por los transportadores de glucosa. Los estudios en humanos y modelos animales han implicado a los transportadores de ácidos grasos de la membrana en diversas alteraciones metabólicas y patologías. Por lo tanto, la expresión selectiva y/o regulación específica de dichos transportadores podría contribuir al control de la internalización de los AGL y los procesos de utilización, permitiendo la captación específica de AGL en el tejido y la utilización de los mismos.

Existen diversos estudios sobre el mecanismo de transporte de AGL a través de la membrana plasmática y cuál es la etapa limitante de este proceso. Cuando se considera la captación celular de los AGL, el transporte físico puede ser considerado como siete pasos secuenciales: 1) la disociación de los AGL de la albúmina extracelular en la fase acuosa; 2) la difusión a través de la fase acuosa externa, 3) la inserción en el exterior de la bicapa de fosfolípidos; 4) "flip-flop" desde el exterior a la hoja interna, que se define como el movimiento completo del AGL a través de la bicapa con la reorientación de la cabeza del grupo carboxilo de la interfaz lípido-agua exterior a la interfaz lípido-agua interior; 5) la disociación de la hoja interna; 6) la difusión a través de la fase acuosa interna, y 7) la unión a proteínas de transporte citoplásmicas (103).

2.1. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES

Determinadas proteínas de membrana juegan un importante papel en la captación e internalización celular de los AGL, denominadas proteínas transportadoras de AGL. Se han identificado 3 grupos principales de proteínas transportadoras de AGL a partir de estudios genéticos en líneas celulares,

como son: las FATP1-6 (104), la FABPpm (105), y la CD36 (106).

2.1.1. Proteínas de transporte de ácidos grasos (FATPs)

Schaffer y Lodish identificaron una proteína que, cuando se expresaba en células COS7, producía un aumento de la absorción de AGL marcados con fluorescencia y la denominaron FATP (107). Se han descrito 6 isoformas de FATP con un perfil de expresión diferente. FATP1 se expresa en muchos tejidos, incluyendo el cerebro, riñón, pulmón, piel, tejido adiposo, corazón y músculo esquelético. FATP2 se expresa principalmente en hígado y riñón, así como en el intestino, mientras que FATP3 se expresa fundamentalmente en hígado, pulmón, testículos y piel. FATP4 se expresa en el intestino, cerebro, riñón, hígado, piel, pulmón, corazón y músculo esquelético. FATP5 sólo se expresa en hígado mientras que FATP6 se expresa en corazón, músculo esquelético, placenta, testículos, glándulas suprarrenales, riñones, vejiga, útero y piel (103). La expresión de las FATPs aumenta el transporte de AGL con distintos grados de eficacia. FATP1, 2 y 4 son particularmente eficaces en facilitar el transporte de AGL de cadena larga, mientras que FATP3 y 5 proporcionan un aumento más modesto y FATP6 no es funcional como transportador de AGL de cadena larga (108).

2.1.2. Proteína receptora de ácidos grasos asociada a la membrana plasmática (FABPpm)

Identificada en 1985, la FABPpm fue el primer transportador de AGL conocido y desde entonces se ha descrito su expresión en el hígado, tejido adiposo, músculo cardíaco y músculo esquelético (109). No obstante, su función como transportadora de AGL depende en gran medida de su unión en la membrana plasmática con la CD36 (110).

2.1.3. Ácido graso translocasa CD36 (CD36)

La CD36 se identificó inicialmente en plaquetas como una glicoproteína de membrana de 88 kDa, y posteriormente en una gran variedad de células: macrófagos, adipocitos, miocitos, enterocitos y hepatocitos, entre otras (111). Actualmente se sabe que la CD36 desempeña un papel importante en facilitar la captación y el tráfico intracelular de AGL, así como en la esterificación de AGL a TG en células cardíacas y musculo-esqueléticas (112). Esta función depende principalmente de su translocación a la membrana plasmática desde depósitos intracelulares (113), por lo que se la denomina ácido graso translocasa. La insulina, la contracción muscular y el factor de transcripción FoxO1 inducen la translocación o movilización intracelular de la CD36 hacia la membrana plasmática aumentando la captación de AGL (114-116), pero las vías de señalización que regulan la expresión y función de esta translocasa aún no están bien definidas.

3. PAPEL DE CD36 EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA

En condiciones fisiológicas, la expresión de la CD36 en el hepatocito es muy débil, pero se ha comprobado que su expresión aumenta en ratones con hígado graso (117). En este sentido, se ha demostrado que los niveles de ARNm de la CD36 aumentan concomitantemente con el contenido hepático de TG en diferentes modelos animales de esteatosis hepática (118, 119). También se ha descrito que la disminución experimental de la esteatosis hepática en ratón se acompaña de una significativa reducción de los niveles hepáticos de ARNm de la CD36 (120, 121). La demostración por Zhou y cols. (122) de que la CD36 es un gen diana común de los receptores nucleares LXR, PXR y PPAR- γ cuya activación induce esteatosis hepática en ratones normales pero no en ratones con ausencia del gen de la CD36, refuerza aun más el papel crucial de este transportador de AGL en la patogenia de la esteatosis hepática en ratones

(123). En cambio, se sabe poco del papel potencial de la CD36 en fisiopatología humana.

En este sentido, sólo se han publicado dos estudios descriptivos en pacientes con obesidad mórbida con EHGNA. Greco y cols. (124) demostraron que los niveles hepáticos de ARNm de CD36 se correlacionan con el contenido hepático de grasa y Bechmann y cols. (125) encontraron que la abundancia de este transportador de AGL se asociaba significativamente con el grado de apoptosis en el hígado de pacientes con EHNA. No obstante, se desconoce cuál es el nivel de expresión y la distribución celular de la CD36 en el hígado de pacientes con EHGNA y con hepatitis crónica por VHC con o sin esteatosis, así como su potencial relación con las características antropométricas, clínicas e histológicas de estas hepatopatías crónicas.

4. PAPEL DE LA FRACCIÓN SOLUBLE DE CD36 EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA

Recientemente se ha identificado una forma circulante de CD36 en el plasma humano que ha sido denominada CD36 soluble (CD36s) (126). Actualmente se desconoce la estructura de CD36s, si se trata de la proteína CD36 completa o si es un producto de la degradación proteolítica de la misma, así como los mecanismos implicados en la liberación/excreción de la proteína CD36 al torrente sanguíneo. Varios estudios clínicos llevados a cabo por Handberg y cols. mostraron que CD36s se asocia con marcadores de resistencia a la insulina y que su concentración plasmática se correlaciona positivamente con la resistencia a la insulina y con la presencia de arteriosclerosis (127, 128).

La correlación entre las concentraciones circulantes de CD36s y resistencia a la insulina se ha confirmado en estudios clínicos en pacientes obesos con DM2 y en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (129). Dada la estrecha asociación entre la EHGNA y la resistencia a la insulina se ha sugerido que la concentración de CD36s podría estar aumentada en el plasma

de los pacientes con EHGNA. En este sentido, un estudio clínico transversal en sujetos sanos encontró que las concentraciones plasmáticas de CD36s se correlacionaban con la presencia de hígado graso estimado por algoritmos clínicos y analíticos (130). También se ha visto en otro estudio clínico que los pacientes con hepatitis crónica por VHC y esteatosis asociada tenían unas concentraciones plasmáticas de CD36s significativamente más altas que aquellos pacientes sin esteatosis asociada (131). Ambos estudios sugieren que CD36s podría ser un biomarcador del grado de esteatosis hepática, pero se desconoce aún si la concentración plasmática de CD36s se correlaciona con la cantidad de grasa en el hígado y si existe alguna relación con el nivel de expresión intrahepático de CD36 en pacientes con EHGNA. En cualquier caso, sería de gran utilidad clínica conocer el papel de la determinación de las concentraciones circulantes de CD36s en el diagnóstico no invasivo de la EHGNA.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La EHGNA engloba un amplio espectro de lesiones en el hígado, que se producen en ausencia de un consumo crónico de alcohol, en el que se incluyen la esteatosis simple, la esteatohepatitis con estadios variables de fibrosis y la cirrosis. Actualmente se considera que la EHGNA es el componente hepático del síndrome metabólico y, debido a la creciente incidencia de este trastorno metabólico en los países desarrollados, la EHGNA está emergiendo como una de las enfermedades hepáticas más frecuentes en nuestro medio. A pesar de ello, aun no están bien definidos los mecanismos moleculares implicados en su patogenia ni se han identificado marcadores séricos de eficacia probada para su diagnóstico no invasivo. La **hipótesis** de este trabajo de Tesis Doctoral se fundamenta en la sólida evidencia experimental que demuestra que la CD36, una glicoproteína de membrana que facilita la captación y transporte intracelular de AGL, juega un papel crucial en la patogenia de la esteatosis hepática en el ratón pero se desconoce su potencial relevancia en pacientes con EHGNA. Recientemente se ha demostrado que los pacientes con resistencia a la insulina y síndrome metabólico tienen concentraciones séricas elevadas de la fracción soluble de la CD36 (CD36s), sugiriendo que la determinación sérica de CD36s podría ser útil para el diagnóstico no invasivo de la EHGNA. Con el **objetivo general** de conocer en mayor detalle el papel potencial de la CD36 y de CD36s en la patogenia y en el diagnóstico no invasivo, respectivamente, de la EHGNA, en este trabajo de Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes **objetivos concretos**:

- 1.- Caracterizar el perfil de expresión de la CD36, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en el hígado de pacientes con EHGNA y con hepatitis crónica por VHC, y su relación con las características antropométricas, clínicas e histológicas de estos pacientes.
- 2.- Determinar las concentraciones séricas de CD36s y su valor como marcador diagnóstico en pacientes con EHGNA y con hepatitis crónica por VHC.

3.- Analizar la posible relación entre las concentraciones circulantes de CD36s y el nivel de expresión de la CD36 en el hígado de pacientes con EHGNA.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y CONTROLES SANOS

Se incluyeron en este trabajo de Tesis Doctoral un total de 314 pacientes, de los cuales 227 tenían EHGNA y 87 tenían hepatitis crónica por VHC. Además, se incluyeron 85 individuos con una biopsia hepática normal que fueron considerados como controles sanos.

1.1. PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE CD36 EN EL HÍGADO

En este estudio se incluyeron 130 pacientes, de los que 34 tenían esteatosis simple no alcohólica (ESNA), 30 esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y 66 hepatitis crónica por VHC. Se estudiaron además 32 controles sanos.

1.2. PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE LA FRACCIÓN SOLUBLE DE CD36 EN EL SUERO

En este estudio se incluyó una población total de 314 pacientes (227 con EHGNA y 87 con hepatitis crónica por VHC). Además, se estudiaron 85 controles sanos.

1.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los criterios de inclusión en este estudio para los pacientes con EHGNA fueron:

- Edad entre 18 y 70 años
- Ausencia de ingesta de alcohol

- Presencia de esteatosis en la biopsia hepática con o sin necroinflamación y/o fibrosis
- Ausencia de infección por VHC, VHB y Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
- Ausencia de ingesta de fármacos potencialmente hepatotóxicos
- Ausencia de otras causas potenciales de enfermedad hepática
- Firma del consentimiento informado.

Los criterios de inclusión en este estudio para los pacientes con hepatitis crónica por VHC fueron:

- Edad entre 18 y 70 años
- Ausencia de ingesta de alcohol
- Ausencia de infección por VHB y VIH
- Seropositividad de anticuerpos anti-VHC y de ARN del VHC
- Genotipos 1 y/o 2 del VHC
- Firma del consentimiento informado.

Los criterios de inclusión en este estudio para los controles sanos fueron:

- Edad entre 18 y 70 años
- Ausencia de ingesta de alcohol
- Biopsia hepática con hígado histológicamente normal
- Valores normales en suero de glucosa, colesterol, triglicéridos y transaminasas
- Ausencia de infección por VHC, VHB y VIH.
- Ausencia de ingesta de fármacos potencialmente hepatotóxicos
- Ausencia de otras causas potenciales de enfermedad hepática
- Firma del consentimiento informado.

Todos aquellos pacientes y controles sanos que no cumplían la totalidad de los criterios de inclusión mencionados fueron excluidos del estudio.

2. DATOS CLÍNICOS

A cada uno de los pacientes y controles incluidos en este estudio se le recogieron sus datos demográficos, antropométricos y clínicos mediante una anamnesis y una exploración física completas. El IMC se calculó dividiendo el peso en kilogramos (kg) por la talla en metros al cuadrado (m^2). Se definió peso normal como un $IMC \leq 25$, sobrepeso como un IMC entre 25,1 y 29,9, obesidad como un $IMC \geq 30$ y obesidad mórbida como un $IMC \geq 40$.

3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

A toda la población de estudio se le realizó, en condiciones de ayuno, las siguientes determinaciones analíticas en sangre:

Generales: hemoglobina, hematocrito, leucocitos y fórmula, plaquetas, actividad de protrombina, glucosa, ácido úrico, aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina total, proteínas totales, albúmina, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, colesterol-VLDL y triglicéridos.

Insulina en plasma: se determinó mediante un enzimoimmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes (ARCHITECT insulin; Abbot Park, IL) y posterior lectura en un autoanalizador AxSYM® (Abbot Park, IL). Como marcador de resistencia a la insulina se utilizó el índice HOMA, que se calculó mediante la fórmula: $\text{insulina } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucosa } (\text{mmol/L}) / 22,5$ (132).

Marcadores víricos: La presencia de anticuerpos anti-VHC en el suero se determinó mediante un test de ELISA (Ortho Diagnostic test Systems, Raritan, NJ). El ARN del VHC se cuantificó en el suero mediante PCR (Amplicor™ VHC 2.0, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) y el genotipo del VHC se determinó por una técnica de hibridación inversa (VHC genotipo 2.0 ensayo LIPA, Roche Diagnostics). La presencia en el suero del antígeno de superficie del VHB y de anticuerpos frente al VIH se analizó mediante ensayos inmunoenzimáticos específicos (Murex, Dartford, Reino Unido).

4. BIOPSIA HEPÁTICA

A todos los pacientes y controles incluidos en el estudio se les realizó una biopsia hepática tras la firma del consentimiento informado. La biopsia hepática se realizó por vía percutánea bajo control ecográfico o por vía percutánea bajo control laparoscópico durante un procedimiento programado de colecistectomía o gastroplastia.

El cilindro hepático obtenido se cortó en dos porciones, una fue procesada para estudio anatomopatológico tras fijación en formaldehído al 10% y la otra se congelaba inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaba a -80°C.

5. ESTUDIOS EN TEJIDO HEPÁTICO

5.1. EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA

Todas las biopsias hepáticas se incluyeron en bloques de parafina y se realizaron cortes de 4-6 μm de espesor que fueron posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson, entre otras técnicas. Las biopsias incluidas en este estudio se evaluaron e interpretaron por un patólogo experimentado que desconocía los datos clínicos de los pacientes. Como norma general y para realizar una evaluación histopatológica adecuada, se excluían las biopsias hepáticas de menos de 1,5 cm de largo o que mostraban menos de 10 espacios porta completos.

La esteatosis se evaluó según la clasificación de Brunt (79) y se utilizó el sistemas de puntuación de Kleiner (80) para estimar el grado de balonización hepatocelular y la inflamación lobulillar, así como el estadio de fibrosis en la EHGNA.

Se establecieron los siguientes criterios para cuantificar las lesiones histológicas en el grupo de pacientes con EHGNA:

- Grado de esteatosis
 - Grado 0: < 5% de hepatocitos esteatósicos

- Grado 1: > 5% - < 33% de hepatocitos esteatósicos
- Grado 2: > 33% - < 66% de los hepatocitos están afectados
- Grado 3. > 66% de hepatocitos esteatósicos
- Actividad necroinflamatoria:
 - Grado 1 (leve): Esteatosis menor del 66%, algunos hepatocitos balonizados en la zona 3, escasos neutrófilos y/o linfocitos también en la zona 3, inflamación portal mínima o inexistente
 - Grado 2 (moderada): Esteatosis de cualquier grado, abundantes hepatocitos balonizados en la zona 3, numerosos neutrófilos también en la zona 3 e inflamación portal
 - Grado 3 (severa): Esteatosis panlobulillar, degeneración balonzante difusa, infiltración difusa por neutrófilos e inflamación portal
- Estadio fibrosis
 - 0: sin fibrosis
 - 1: Fibrosis perisinusoidal/pericelular en la zona 3
 - 2: Fibrosis perisinusoidal/pericelular en la zona 3 y fibrosis portal o periportal
 - 3: Fibrosis perisinusoidal/pericelular en la zona 3 y fibrosis portal y fibrosis en puentes focal o extensa
 - 4: Cirrosis

En el grupo de pacientes con hepatitis crónica por VHC, el grado de actividad necroinflamatoria y el estadio de fibrosis se estableció de acuerdo con el sistema METAVIR (133), en el cual se valoran de forma semicuantitativa los siguientes ítems:

1. Necrosis lobulillar

- 0 = ningún foco de necrosis por lobulillo
- 1 = menos de un foco de necrosis
- 2 = al menos un foco de necrosis por lobulillo
- 3 = intensa actividad necroinflamatoria por lobulillo o la presencia de puentes confluentes de necrosis.

2. Inflamación lobulillar o celularidad sinusoidal

- 0 = ausencia o poca cantidad de células infiltrando los sinusoides

1 = moderada o abundante cantidad de células sinusoidales

3. Esteatosis

0 = ausencia o escasas vacuolas de grasa en todo el espécimen

1 = presencia de una mayor cantidad de vacuolas de grasa, $\geq 10\%$.

4. Inflamación portal

0 = ausente

1 = presencia de agregados mononucleares en algunos tractos portales

2 = agregados mononucleares en todos los tractos portales

3 = grandes y densos agregados mononucleares en todos los tractos portales.

5. Agregados o folículos linfoides portales

0 = ausencia

1 = presencia de uno o más

6. Necrosis parcelar o piecemeal necrosis

0 = ausente

1 = alteración focal del área periportal en algunos tractos portales

2 = alteración difusa del área periportal en algunos tractos portales o lesiones focales circundando todos los tractos portales

3 = alteración difusa del área periportal en todos los tractos portales

7. Puentes de necrosis

0 = ausencia

1 = presencia.

8. Fibrosis o estadio

0 = ausencia de fibrosis portal

1 = tractos portales fibróticos y aumentados de tamaño

2 = presencia de fibrosis periportal o septos fibrosos porta-porta pero con arquitectura hepática intacta

3 = fibrosis con distorsión de la arquitectura pero sin cirrosis

4 = probable o definitiva cirrosis

Los pacientes con hepatitis crónica por el VHC se clasificaron en dos grupos, dependiendo de la presencia o no de esteatosis.

5.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CD36 POR PCR A TIEMPO REAL

Se extrajo el ARN total de todas las biopsias hepáticas incluidas en este estudio utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies, Carlsbad, California), según el protocolo recomendado por el fabricante, basado en el método de Chomczynski y Sacchi (134). A continuación, se sintetizó el ADNc utilizando el High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) y se procedió a su amplificación mediante reacciones de PCR a tiempo real en un StepOne Plus (Applied Biosystems). Se utilizaron los siguientes primers TaqMan (Applied Biosystems) comerciales: CD36 (nº acceso GenBank: NM_001001547.2 y Hs01567186_m1) y 18S ARNr (nº acceso GenBank: X03205.1 y 4319413E). Las muestras de tejido hepático amplificadas se analizaron por triplicado. Los cambios relativos en los niveles de expresión de genes se determinaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

5.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE CD36 POR WESTERN BLOTTING

Se extrajeron las proteínas de cada una de las biopsias hepáticas incluidas en este estudio mediante su homogenización en un medio que contenía: 10 mM de Tris-HCl a pH 7,5 + 1 mM de $MgCl_2$ + 1 mM de EGTA + 10% de glicerol + 0,5% de 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) + 1 mM de β -mercaptoetanol y 0,1 mM de PMSF. Los extractos proteínicos obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de 8-15% de SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a una membrana HybondP (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). A continuación, la membrana se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CD36 diluido 1:1000, toda la noche a 4 °C y en agitación. Este anticuerpo primario reconoce los aminoácidos 100-300 de la CD36 de origen humano (sc-9154, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California) y produce una banda específica de 88 kDa en lisados de células humanas (135). Posteriormente, la membrana se

incubó con 20 ml de la solución de incubación conteniendo un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa a una dilución 1:7000, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. Tras lavar la membrana adecuadamente, estas se revelaron utilizando un kit de luminiscencia (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Como control de carga proteica, cada membrana se incubó con un anticuerpo policlonal anti- β -actina en las mismas condiciones experimentales mencionadas. La cuantificación de las bandas de la CD36 y de la β -actina se realizó mediante una cámara CDD en analizador de luminiscencia (Gel-Doc, Bio-Rad).

5.4. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CD36

La expresión hepática de CD36 se determinó por inmunohistoquímica en secciones de 5 μ m de biopsias hepáticas parafinadas procedentes de 66 pacientes con EHGNA (34 pacientes con ESNA y 32 con EHNA), 64 pacientes con hepatitis por VHC genotipo 1 y 32 sujetos con hígado histológicamente normal (HN).

Los cortes de tejido hepático se desparafinaron en xileno y posteriormente se procedió a la recuperación antigénica mediante la cocción de los cortes en un horno microondas durante 10 minutos en 10 mM de tampón citrato, pH 6.0 (Chemmate TM Target Retrieval Solution, Dako). Tras un periodo de 20 minutos a temperatura ambiente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario de conejo contra la CD36 sc-9154 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU) diluido a 1:250, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. A continuación, los cortes se incubaron con un anticuerpo secundario policlonal biotinilado de cabra anti-conejo y después con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Finalmente los cortes se revelaron tras su incubación con 0,5 mg/ml de 3,3'-diaminobencidina y peróxido de hidrógeno. Como control negativo, se utilizaron secciones seriadas de tejido hepático incubadas únicamente con el anticuerpo secundario.

El patrón de expresión y la distribución celular y subcelular de la CD36 se analizó mediante un microscopio óptico (Nikon Eclipse E400) equipado con objetivos planApocromatic 20x y 40x (Nikon). El área de tejido hepático ocupado por las células que expresaban la CD36 se evaluó mediante una cámara de vídeo digital de alta resolución (Nikon DXM 1200, Tokio, Japón) conectado a un microscopio óptico (Nikon Eclipse E400) equipado con un objetivo de 20x planApocromatic (Nikon). Se evaluaron cinco áreas lobulillares al azar, considerando como célula positiva toda aquella teñida de marrón, sin diferenciar entre células sinusoidales y hepatocitos. Los criterios de aceptación de un área seleccionada al azar para su posterior análisis fueron: 1) la total cobertura del campo a estudiar con un aumento de 20x y 2) la integridad del tejido hepático. La evaluación computarizada se realizó con el software analySIS[®] (Soft Imaging System GmbH, Münster, Alemania). El valor promedio fue considerado como el índice de expresión de CD36 para cada muestra de biopsia hepática, y representa el porcentaje del área de tejido hepático ocupado por células que expresan CD36.

6. ESTUDIOS EN SUERO

6.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CD36 SOLUBLE (CD36S)

Se cuantificó la concentración de CD36s en muestras de suero almacenadas a -80°C de todos los pacientes incluidos en este estudio, mediante un kit de enzimoimmunoanálisis comercial (ELISA CD36s humano, Cusabio Biotech, Wuhan, China). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, los controles internos y las muestras de suero se analizaron por triplicado en placas de 96 pocillos. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 4,4 % y 7,2 % , respectivamente. El nivel detectable mínimo de CD36s para este ensayo ELISA era de 4 pg/ml.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS versión 15.0 (SPSS, Cary, Carolina del Norte, EE.UU). Se consideró estadísticamente significativo un nivel de confianza mayor del 95%, es decir, todo valor de $p < 0,05$. En este trabajo de Tesis Doctoral, las variables categóricas se representan como frecuencia absoluta y porcentaje. Las variables continuas se muestran como tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar y rango intercuartílico). La comparación de porcentajes de las variables categóricas se realizó mediante el test de χ^2 de Pearson. La comparación de las medias de variables continuas se realizó mediante la prueba de t de Student. Cuando estas variables no tenían una distribución normal, se utilizó el test de Mann-Whitney para muestras no pareadas. Cuando existía más de dos grupos independientes, la comparación de sus medias se realizó mediante el análisis de la varianza ANOVA, si la distribución de las variables era normal y las varianzas homogéneas, y el test de Kruskal-Wallis si no se cumplían estas condiciones. Los datos de PCR cuantitativa a tiempo real, Western blot e inmunohistoquímica se muestran como media \pm una desviación estándar, y se compararon mediante la prueba de ANOVA y el test de Kruskal-Wallis. El coeficiente de correlación de Spearman (ρ) se utilizó para evaluar las correlaciones entre las variables de estudio. En el estudio de la determinación de CD36s en el suero, se llevó a cabo un análisis de regresión logística múltiple ajustado por factores de confusión para comprobar la independencia de las asociaciones de la variable dependiente (esteatosis ≥ 2 , esteatosis avanzada) con sus correlatos significativos en los modelos bivariados y con los que se consideraron de interés clínico. Para evaluar la precisión diagnóstica de las concentraciones séricas de CD36s y otras variables asociadas con esteatosis avanzada en pacientes con EHGNA, se utilizaron curvas ROC y la posterior determinación del área bajo la curva ROC (AUROC).

8. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por un Comité de Ética de Investigación Clínica. Todos los pacientes y sujetos sanos firmaron un consentimiento informado previo a la inclusión en el estudio.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS EN TEJIDO HEPÁTICO

1.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y CONTROLES SANOS

Las características de los pacientes con EHGNA y hepatitis crónica por VHC, estratificados según el diagnóstico histológico, así como las de los sujetos con hígado normal se muestran en las Tabla 3 y Tabla 4, respectivamente. Todos los grupos de pacientes eran comparables en términos de edad y sexo. No existían diferencias estadísticamente significativas en los parámetros hematológicos de los diferentes grupos de pacientes estudiados.

En la cohorte de pacientes con EHGNA, los pacientes con ESNA tenían concentraciones de insulina, GGT y un índice HOMA significativamente superiores a los individuos con hígado histológicamente normal (HN) ($p < 0,05$ en todos los casos). En los pacientes con EHNA, el IMC y el índice HOMA así como las concentraciones de insulina, triglicéridos, ALT, AST y GGT fueron significativamente mayores que en los individuos con HN ($p < 0,05$ en todos los casos). Además, los pacientes con EHNA tenían un IMC y una concentración sérica de ALT significativamente mayor que los pacientes con ESNA ($p < 0,05$).

En cuanto a los pacientes con hepatitis VHC genotipo 1 con esteatosis asociada, las concentraciones de insulina y de GGT así como el índice HOMA eran significativamente superiores ($p < 0,05$ en todos los casos) que las de aquellos sin esteatosis concomitante. No existían diferencias significativas en ambos grupos de pacientes con respecto a otros parámetros.

Tabla 3. Características de la población con enfermedad hepática grasa no alcohólica y con hígado normal incluida en el estudio histológico

| Características | HN | ESNA | EHNA |
|--|--------------|---------------|-----------------|
| Número | 32 | 34 | 30 |
| Edad (años) | 51,2 ± 12,9 | 47,7 ± 13,5 | 47,6 ± 12,6 |
| Sexo (Hombre/Mujer) | (14/18) | (15/19) | (14/16) |
| % Mujeres | 56,2 % | 55,9 % | 53,3 % |
| IMC (kg/m ²) | 28,1 ± 4,6 | 28,4 ± 3,5 | 30,1 ± 3,7 * # |
| Glucosa (mg/dL) | 93,4 ± 8,4 | 95,7 ± 9,2 | 93,5 ± 9,7 |
| Insulina (μU/L) | 6,7 ± 2,6 | 11,2 ± 6,8* | 13,8 ± 4,9 * |
| HOMA | 0,87 ± 0,35 | 1,47 ± 0,87* | 1,77 ± 0,57 * |
| Triglicéridos (mg/dL) | 104,5 ± 33,5 | 148,0 ± 44,6 | 151,5 ± 48,6 * |
| Colesterol-HDL (mg/dL) | 49,1 ± 9,2 | 48,1 ± 14,1 | 45,6 ± 9,6 |
| ALT (UI/L) | 15,5 ± 5,8 | 25,4 ± 15,2 | 35,5 ± 23,0 * # |
| AST (UI/L) | 17,3 ± 4,3 | 20,3 ± 6,9 | 23,8 ± 10,8 * |
| GGT (UI/L) | 31,0 ± 34,9 | 50,2 ± 33,3 * | 61,1 ± 59,0 * |
| Esteatosis (%) | | | |
| Grado 0 | 32 (100 %) | | |
| Grado 1 | | 34 (100 %) | 9 (30,0 %) |
| Grado 2 | | | 13 (43,3 %) |
| Grado 3 | | | 8 (26,7 %) |
| Fibrosis (%) | | | |
| Estadio 0 | 32 (100 %) | 34 (100 %) | |
| Estadio 1 | | | 16 (53,3 %) |
| Estadio 2 | | | 9 (30,0 %) |
| Estadio 3 | | | 5 (16,7 %) |
| Inflamación lobulillar- balonización (%) | | | |
| Grado 0 | 32 (100 %) | 34 (100 %) | |
| Grado 1 | | | 10 (33,3 %) |
| Grado 2 | | | 15 (50,0 %) |
| Grado 3 | | | 5 (16,7 %) |

HN: Hígado normal. ESNA: Esteatosis simple no alcohólica. EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica. IMC: Índice de masa corporal. HOMA: Índice de resistencia a la insulina. HDL: Lipoproteína de alta densidad. ALT: Alanino aminotransferasa. AST: Aspartato aminotransferasa. GGT: Gamma-glutamiltanspeptidasa.

Diferencias significativas entre grupos: *p < 0,05 vs HN; #p < 0,05 vs ESNA

Tabla 4. Características de los pacientes con hepatitis crónica por virus C incluidos en el estudio histológico

| Características | VHC | VHC+ESNA |
|--------------------------|-------------|---------------|
| Número | 34 | 32 |
| Edad | 43,4 ± 9,6 | 45,4 ± 10,2 |
| Sexo (Hombre/Mujer) | (16/18) | (13/19) |
| % Mujeres | 52,9% | 59,4% |
| IMC (kg/m ²) | 25,7 ± 3,0 | 27,3 ± 3,34 |
| Glucosa (mg/dL) | 93,5 ± 9,7 | 101,5 ± 24,0 |
| Insulina (μU/L) | 8,6 ± 3,7 | 13,6 ± 4,8 * |
| HOMA | 1,14 ± 0,67 | 1,96 ± 0,70 * |
| Triglicéridos (mg/dL) | 85,9 ± 36,2 | 93,8 ± 33,3 |
| Colesterol-HDL (mg/dL) | 48,9 ± 6,8 | 48,8 ± 7,4 |
| ALT (UI/L) | 82,0 ± 53,3 | 89,3 ± 46,3 |
| AST (UI/L) | 45,5 ± 20,8 | 58,8 ± 30,0 |
| GGT (UI/L) | 44,5 ± 33,9 | 71,4 ± 38,6 * |
| Genotipo 1 (%) | 29 (76,3%) | 38 (77,6%) |
| Genotipo 2 (%) | 9 (23,7%) | 11 (22,4%) |
| ARN-VHC | | |
| > 850.000 UI/ml | 15 (44,1%) | 14 (43,7%) |
| < 850.000 UI/ml | 19 (55,9%) | 18 (56,3%) |
| Esteatosis (%) | | |
| Grado 0 | 34 (100%) | |
| Grado 1 | | 19 (59,4%) |
| Grado 2 | | 9 (28,1%) |
| Grado 3 | | 4 (12,5%) |
| Fibrosis (%) | | |
| Estadio 0 | 9 (26,5%) | 8 (25,0%) |
| Estadio 1 | 12 (32,5%) | 9 (28,1%) |
| Estadio 2 | 9 (26,5%) | 10 (31,3%) |
| Estadio 3 | 4 (11,7%) | 5 (15,6%) |
| Necroinflamación (%) | | |
| Grado 0 | 3 (8,8%) | 3 (9,4%) |
| Grado 1 | 11 (32,4%) | 11 (34,4%) |
| Grado 2 | 15 (44,1%) | 12 (37,5%) |
| Grado 3 | 5 (14,75%) | 6 (18,8%) |

VHC: Virus de la hepatitis C. VHC+ESNA: Virus de la hepatitis C con esteatosis asociada. IMC: Índice de masa corporal. HOMA: Índice de resistencia a la insulina. HDL: Lipoproteína de alta densidad. ALT: Alanino aminotransferasa. AST: Aspartato aminotransferasa. GGT: Gamma-glutamiltanspeptidasa. ARN-VHC: Ácido ribonucleico del virus de la hepatitis C
Diferencias significativas entre grupos: *p < 0,05 VHC vs VHC+ESNA

En lo que se refiere a los hallazgos histológicos, todos los pacientes con ESNA tenían esteatosis leve (grado 1), mientras que el 76% de los pacientes con EHNA tenían esteatosis moderada o severa (grados 2 y 3, respectivamente). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grado de necroinflamación y en el estadio de fibrosis entre los pacientes con hepatitis crónica por VHC con o sin esteatosis asociada.

1.2. EXPRESIÓN GÉNICA DE CD36

En comparación con los individuos con HN (valor normalizado 1,0), los niveles hepáticos de ARNm de CD36 fueron significativamente más altos en los pacientes con ESNA (mediana de veces de incremento: 0,84; rango: 0,15-1,61; $p < 0,001$) y en los pacientes con EHNA (mediana de veces de incremento: 0,91; rango: 0,22 - 1,81; $p < 0,001$) (Figura 3). Los niveles hepáticos de ARNm de CD36 también fueron significativamente más altos en los pacientes con VHC sin esteatosis (mediana de veces de incremento: 0,30; rango 0,17 - 1,59) y en aquellos con esteatosis (mediana de veces de incremento: 0,85; rango 0,15 - 1,98) que en los casos con HN ($p < 0,001$ en ambos casos). Un hecho destacable es que los niveles hepáticos de ARNm de CD36 fueron similares en los pacientes con ESNA y con EHNA ($p = 0,335$), mientras que fueron significativamente más elevados en los pacientes con hepatitis crónica por VHC con esteatosis concomitante que en aquellos sin esteatosis ($p = 0,004$) (Figura 3).

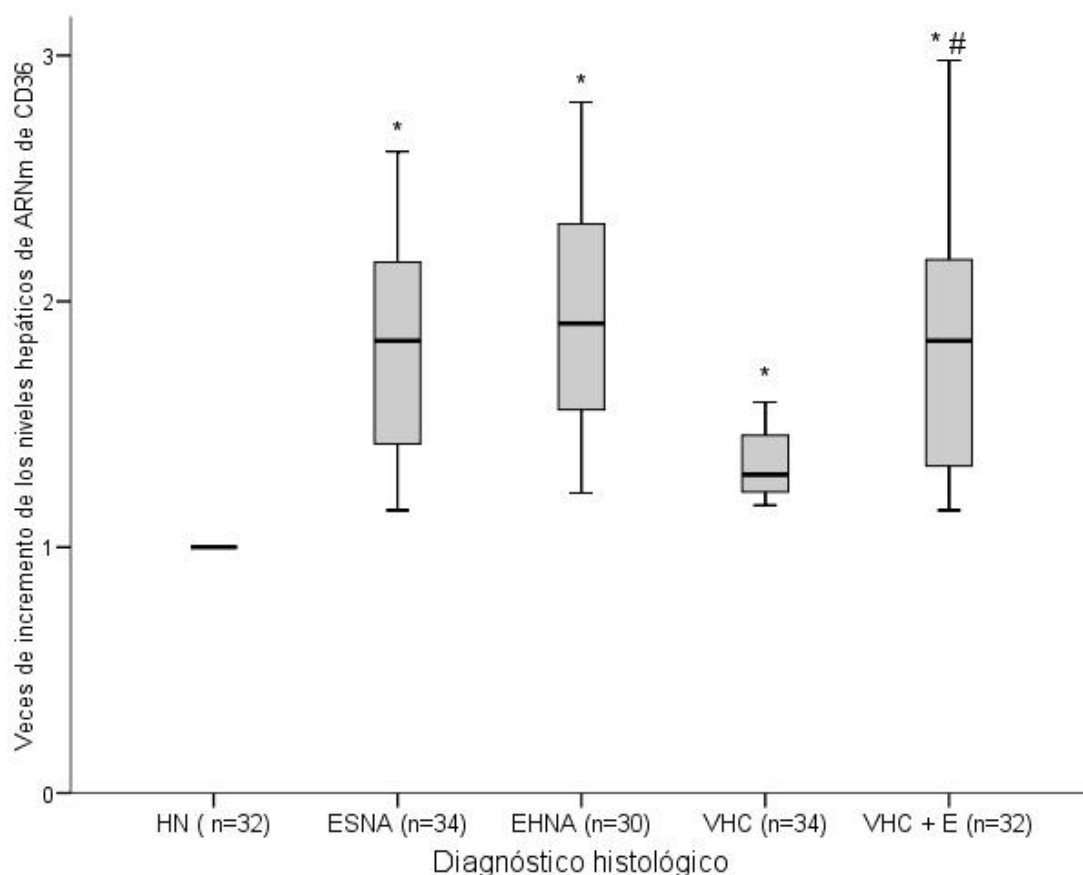


Figura 3. Los niveles de ARNm de CD36 están anormalmente aumentados en el hígado de los pacientes con EHGNA así como de los pacientes con hepatitis crónica por VHC. Los valores representan las veces de incremento en relación con el HN (1,0). El gráfico de barras muestra la mediana \pm rango intercuartílico de los valores relativos de ARNm en los distintos grupos de estudio. HN: Hígado normal. ESNA: esteatosis simple. EHNA: esteatohepatitis. EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica. VHC: virus hepatitis C. VHC+E: virus hepatitis C más esteatosis. Diferencias significativas: * $p < 0,001$ vs HN; # $p = 0,004$ vs VHC

1.3. CONTENIDO PROTEICO DE CD36

En comparación con los individuos con HN (valor normalizado 1,0), se encontró un significativo aumento del contenido hepático de la proteína CD36 en los pacientes con ESNA (mediana de veces de incremento: 0,66; rango: 0,33 - 1,06; $p = 0,001$) y en los pacientes con EHNA (mediana de veces de incremento: 0,81; rango: 0,38 - 0,92; $p < 0,001$) (Figura 4). La cantidad de proteína CD36 también fue significativamente más alta en el hígado de los pacientes con VHC sin esteatosis (mediana de veces de incremento: 0,33; rango 0,29 - 0,52) y en aquellos con esteatosis (mediana de veces de

incremento: 0,87; rango 0,52 - 1,26) que en los casos con HN ($p < 0,001$ en ambos casos) (Figura 5). Vale la pena destacar que no hubo diferencias significativas en el contenido hepático de la proteína CD36 en los pacientes con ESNA y con EHNA ($p = 0,681$), mientras que la cantidad de la proteína CD36 fue significativamente más elevada en el hígado de los pacientes con hepatitis crónica por VHC y esteatosis concomitante que en aquellos sin esteatosis ($p = 0,002$).

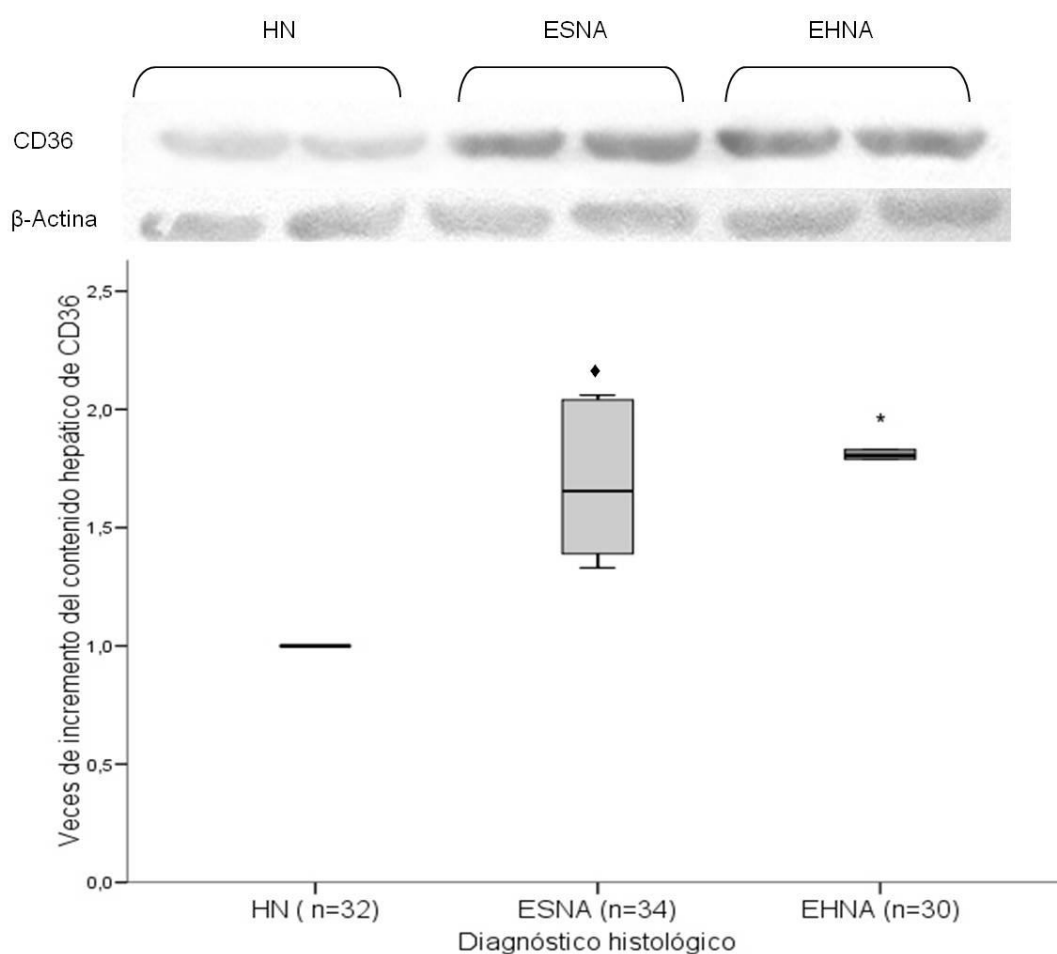


Figura 4. Aumento del contenido hepático de la proteína CD36 en los pacientes con EHNA. En el panel superior se muestran las bandas específicas de CD36 procedentes de inmunoblots representativos de los grupos de pacientes estudiados. Los inmunoblots se cuantificaron por densitometría y se normalizaron contra β -actina como control de carga de proteína. Los valores representan las veces de incremento en relación con el HN (1,0). En el panel inferior, el gráfico de barras muestra la mediana \pm rango intercuartílico de la cantidad de proteína en el hígado de los grupos de estudio. HN: Hígado normal. ESNA: esteatosis simple. EHNA: esteatohepatitis. Diferencias significativas: ♦ $p=0,001$ vs HN; * $p<0,001$ vs HN

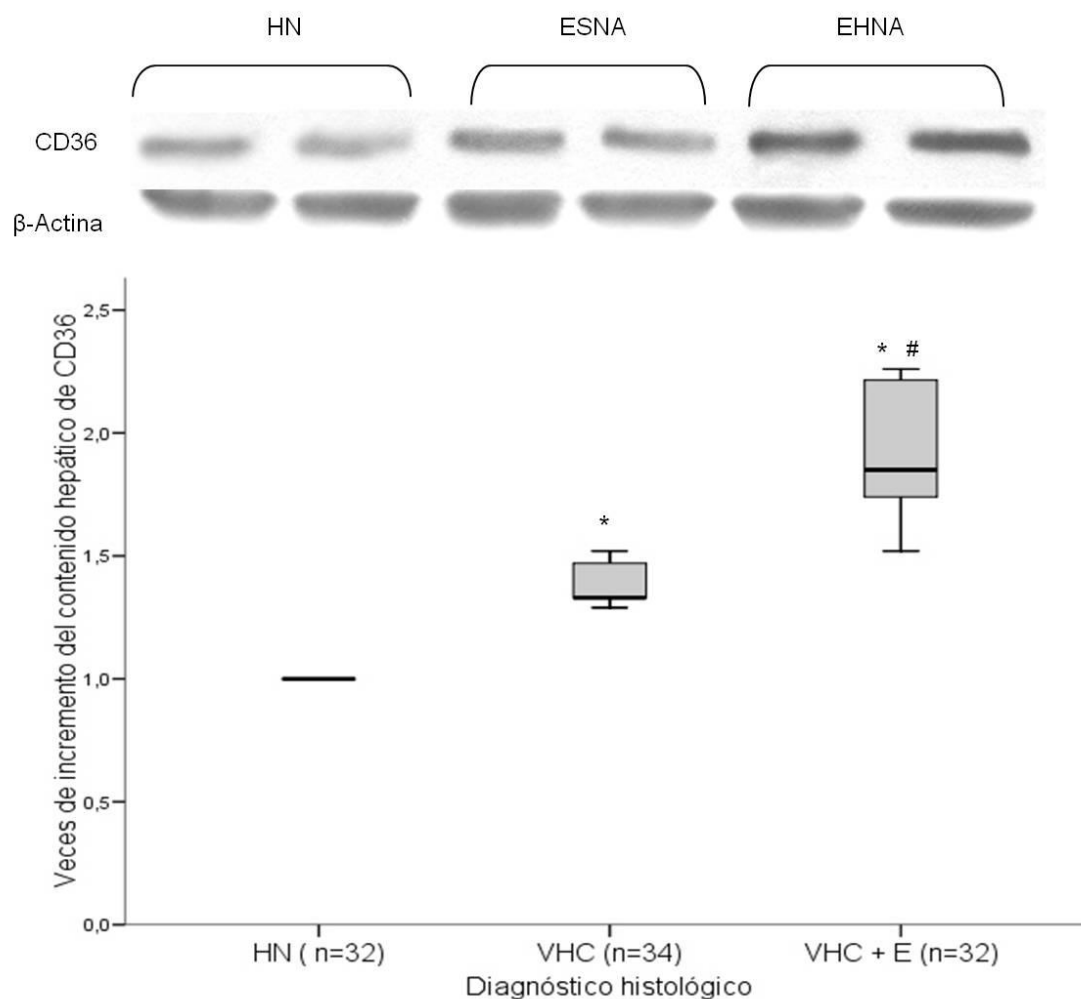


Figura 5. Aumento del contenido hepático de la proteína CD36 en pacientes con hepatitis crónica por VHC. En el panel superior se muestran las bandas específicas de CD36 procedentes de inmunoblots representativos de los grupos de pacientes estudiados. Los inmunoblots se cuantificaron por densitometría y se normalizaron contra β -actina como control de carga de proteína. Los valores representan las veces de incremento en relación con el HN (1,0). En el panel inferior, el gráfico de barras muestra la mediana \pm rango intercuartílico de la cantidad de proteína en el hígado de los grupos de estudio. HN: Hígado normal. VHC: virus hepatitis C. VHC+E: virus hepatitis C más esteatosis.

Diferencias significativas: * $p < 0,001$ vs HN; # $p = 0,002$ vs VHC

1.4. CD36 SE EXPRESA PREDOMINANTEMENTE EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS HEPATOCITOS

En las biopsias hepáticas de los sujetos con HN, la proteína CD36 se expresa débilmente en el citoplasma de algunos hepatocitos dispersos (Figura 6, panel A). Sin embargo, en pacientes con ESNA y con EHNA, además de la

expresión citoplásmica, se observó que CD36 se expresa predominantemente en la membrana plasmática de numerosos hepatocitos (Figura 6, paneles B y C). Por otro lado, en los pacientes con hepatitis crónica por VHC sin esteatosis concomitante, la expresión de CD36 se restringe al citoplasma de los hepatocitos (Figura 6, panel D), mientras que en aquellos con esteatosis asociada CD36 se expresa además en la membrana de los hepatocitos (Figura 6, panel E).

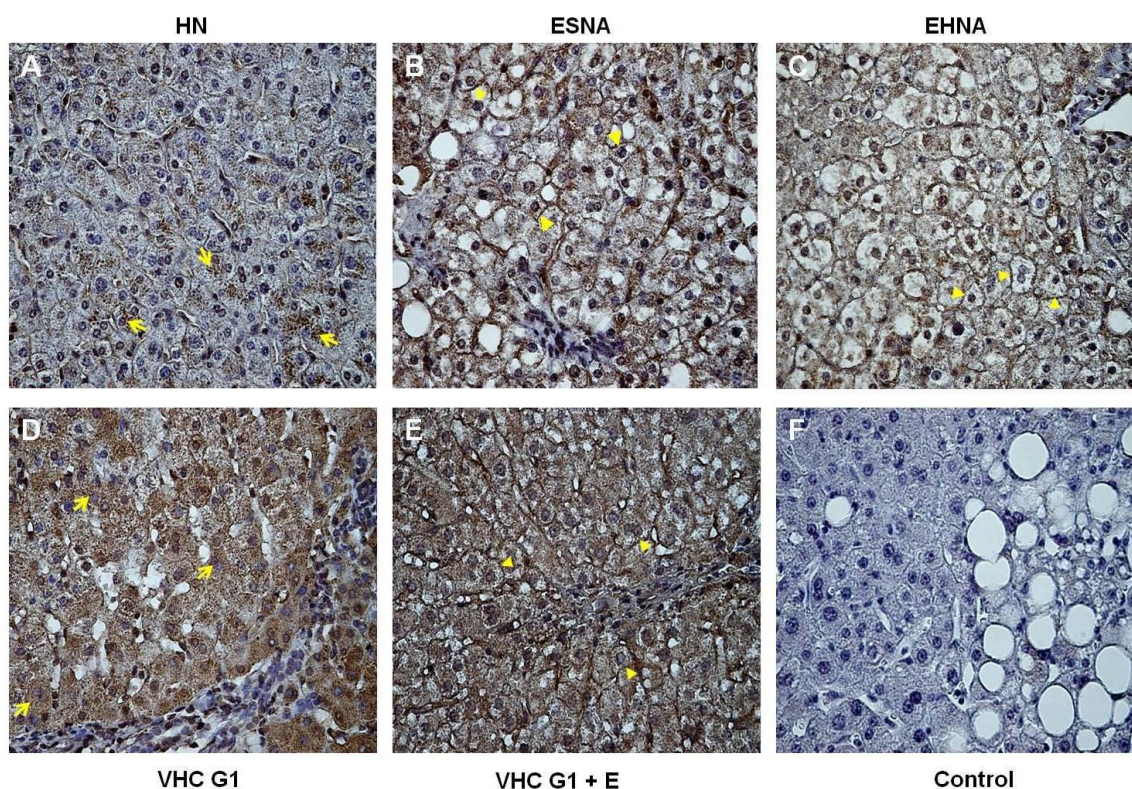


Figura 6. Patrón de expresión de CD36 en el hígado de pacientes con EHGNA y con hepatitis crónica por VHC. En el HN, CD36 se expresa débilmente en el citoplasma de algunos hepatocitos (Panel A, flechas amarillas). Por el contrario, CD36 se expresa fundamentalmente en la membrana plasmática de numerosos hepatocitos en los pacientes con ESNA (Panel B, cabezas de flecha amarillas) y con EHNA (Panel C, cabezas de flechas amarillas). En los pacientes con hepatitis crónica por VHC sin esteatosis asociada, CD36 se expresa en el citoplasma de la mayoría de los hepatocitos (Panel D, flechas amarillas), mientras que en aquellos con esteatosis asociada la expresión de CD36 se observa además en la membrana plasmática de numerosos hepatocitos (Panel E, cabezas de flecha amarillas). En el panel F se muestra la ausencia de inmunotinción cuando el tejido hepático se incubó con inmunoglobulinas de conejo (control negativo). Aumento original de todas las imágenes (400x). HN: Hígado normal. ESNA: esteatosis simple. EHNA: esteatohepatitis no alcohólica. VHC G1: hepatitis crónica por virus C genotipo 1. VHC G1 + E: Hepatitis crónica por virus C genotipo 1 con esteatosis asociada. Control: Control negativo.

Con el fin de comprobar que la tinción obtenida con el anticuerpo policlonal anti-CD36 es específica, se procedió a la incubación de cortes seriados de las biopsias hepáticas en estudio con inmunoglobulinas de conejo obteniendo una mínima o nula tinción en los hepatocitos (Figura 6, panel F), demostrando la especificidad del patrón de inmunotinción de CD36 en las biopsias hepáticas analizadas.

A continuación, se determinó el índice de expresión hepático de CD36 calculando el porcentaje del área del tejido hepático ocupado por los hepatocitos que expresan CD36, tal como se describió anteriormente en el apartado de Material y Métodos. Como se muestra en la Figura 7, el análisis de imágenes asistido por ordenador de las secciones de biopsias hepáticas inmunoteñidas mostró que el índice de expresión hepático de CD36 fue significativamente mayor en los pacientes con ESNA (mediana: 12,82 % (rango: 9,36 - 16,89 %) y en aquellos con EHNA (mediana: 26,77 % (rango: 18,26 - 34,23 %) que en los individuos con HN (mediana: 4,54 % (rango: 3,66 - 6,87 %) ($p < 0,001$ en ambos casos). Por otro lado, en comparación con el índice de expresión hepático de CD36 en el HN, también se encontró que este índice era significativamente mayor en los pacientes con hepatitis crónica por VHC sin esteatosis (mediana: 32,76 % (rango: 28,06 - 40,24 %) y en aquellos con esteatosis asociada (mediana: 43,14 % (rango: 36,89 - 48,66 %) ($p < 0,001$ en ambos casos). Hay que destacar que el índice de expresión hepático de CD36 fue significativamente mayor en los pacientes con EHNA que en aquellos con ESNA ($p < 0,001$) así como también en los pacientes con hepatitis crónica por VHC con esteatosis concomitante en comparación con aquellos sin esteatosis ($p < 0,001$).

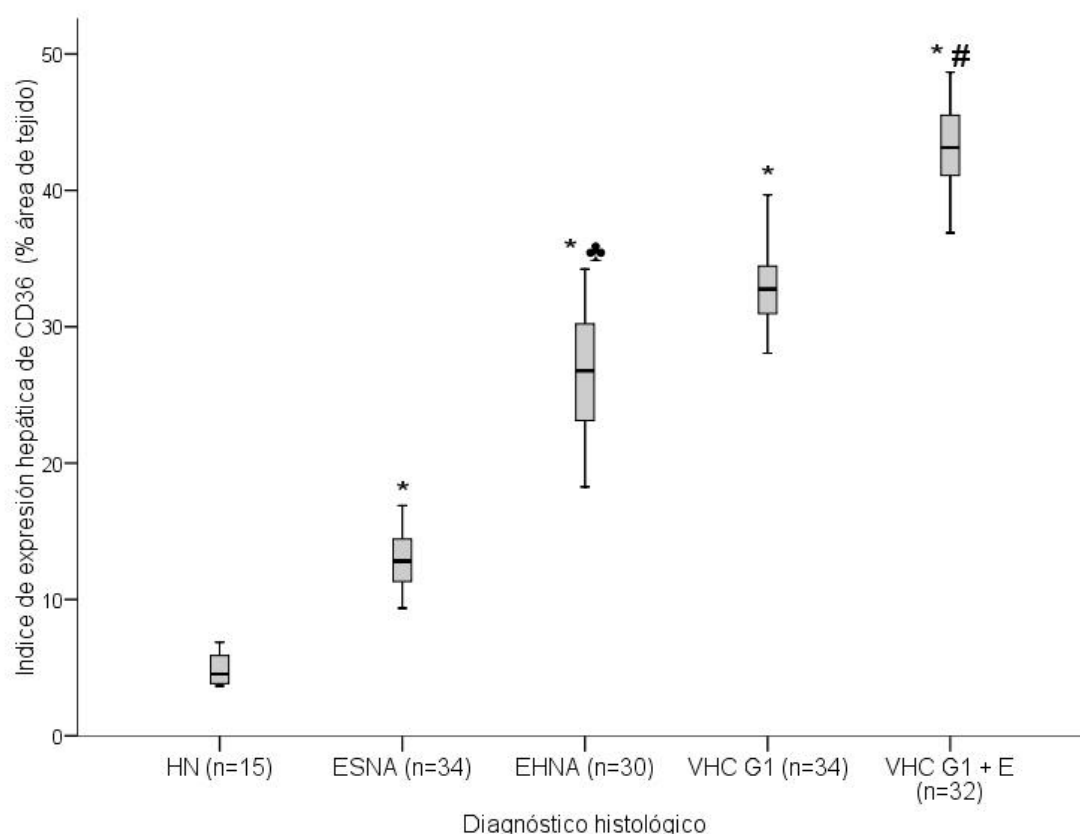


Figura 7. Incremento del índice de expresión hepático de CD36 en los pacientes con EHNA y con hepatitis crónica por VHC. Los valores, que se expresan como mediana y rango intercuartílico, representan el porcentaje del área lobulillar ocupada por hepatocitos que expresan CD36 en las biopsias hepáticas de los distintos grupos de pacientes. HN: Hígado normal. ESNA: Esteatosis simple EHNA. Esteatohepatitis no alcohólica. VHC G1: Hepatitis crónica por virus C genotipo 1. VHC G1 + E: Hepatitis crónica por virus C genotipo 1 con esteatosis asociada.

Diferencias significativas: * $p < 0,001$ vs HN; ♣ $p < 0,001$ vs ESNA;
$p < 0,001$ vs VHC G1.

1.5. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE CD36 Y PARÁMETROS METABÓLICOS E HISTOLÓGICOS

Se comprobó si el índice de expresión hepático de CD36 podría estar relacionado con algunos trastornos metabólicos que son factores de riesgo para el desarrollo de esteatosis, tales como la obesidad y la resistencia a la insulina.

En pacientes con ESNA, no se encontró correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el IMC ($r = 0,176$; $p = 0,319$) (Figura 8), pero sí se observó una correlación positiva con la concentración plasmática de insulina ($r = 0,732$; $p < 0,001$) (Figura 9) y con el índice HOMA ($r = 0,775$; $p < 0,001$) (Figura 10).

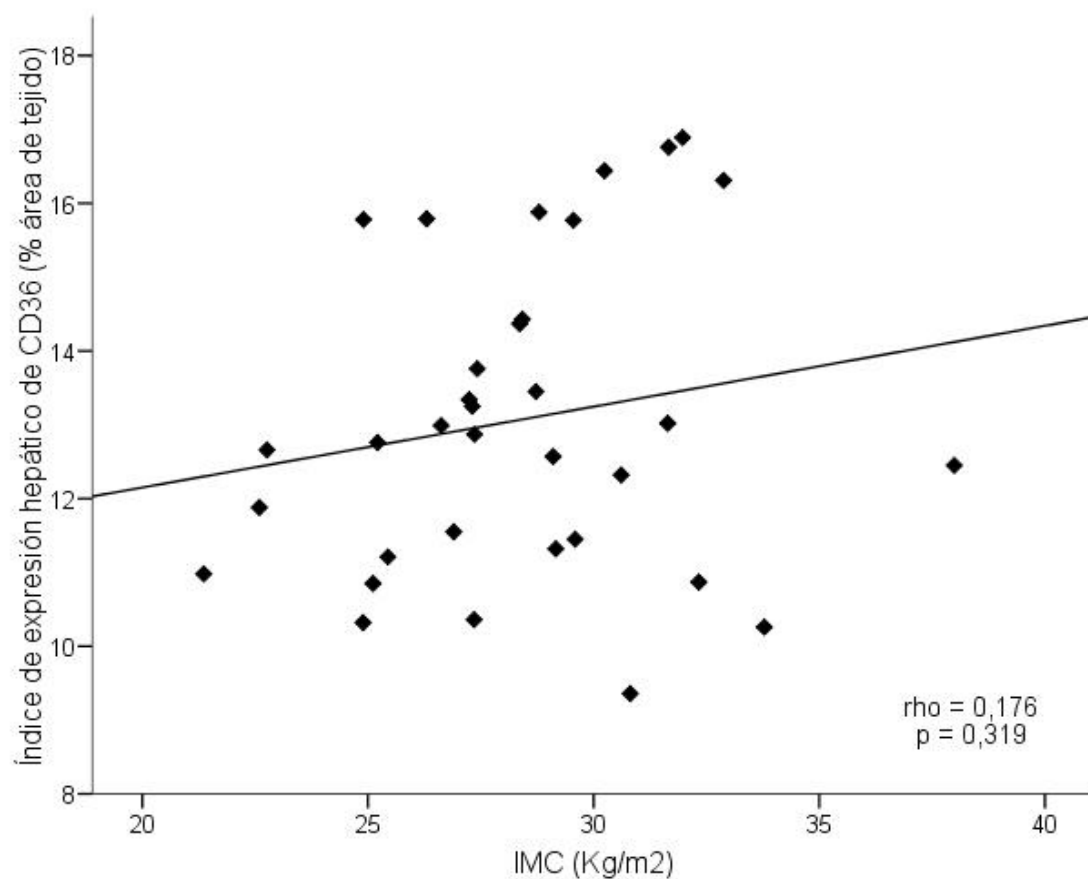


Figura 8. Ausencia de correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de masa corporal (IMC) en pacientes con esteatosis simple no alcohólica.

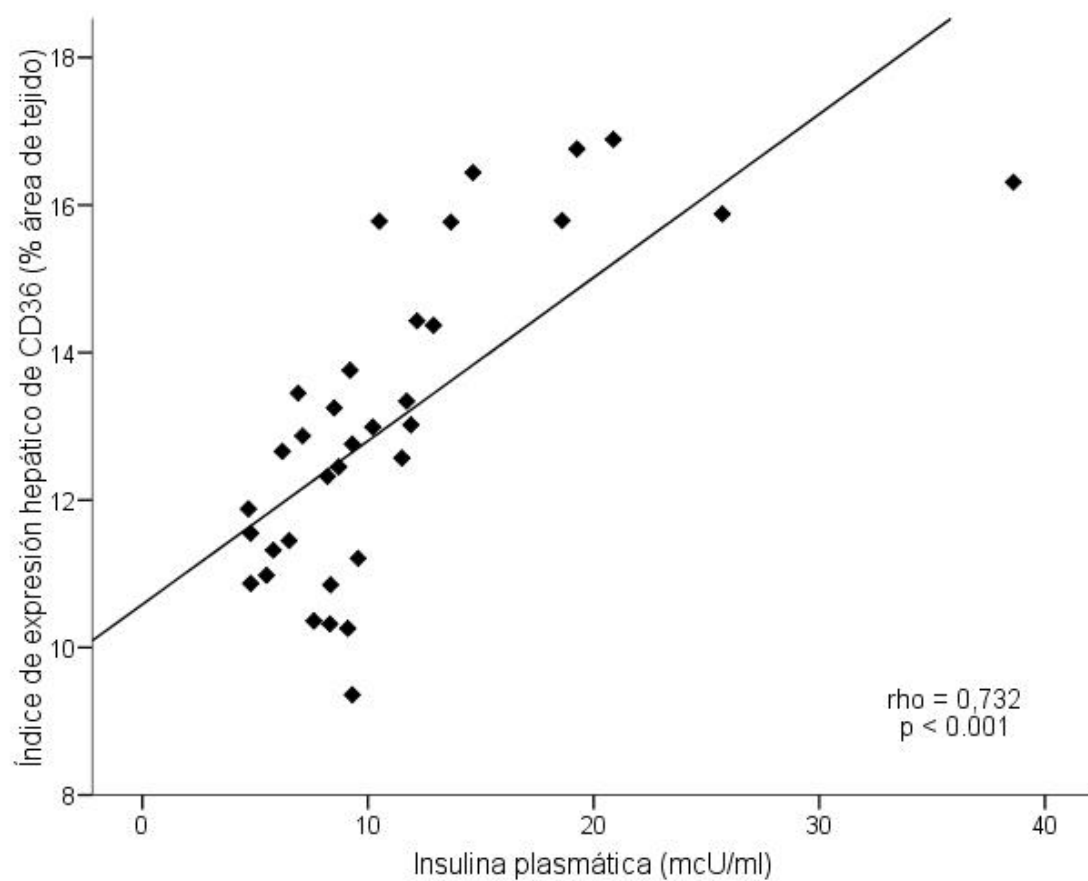


Figura 9. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y la concentración plasmática de insulina en pacientes con esteatosis simple no alcohólica.

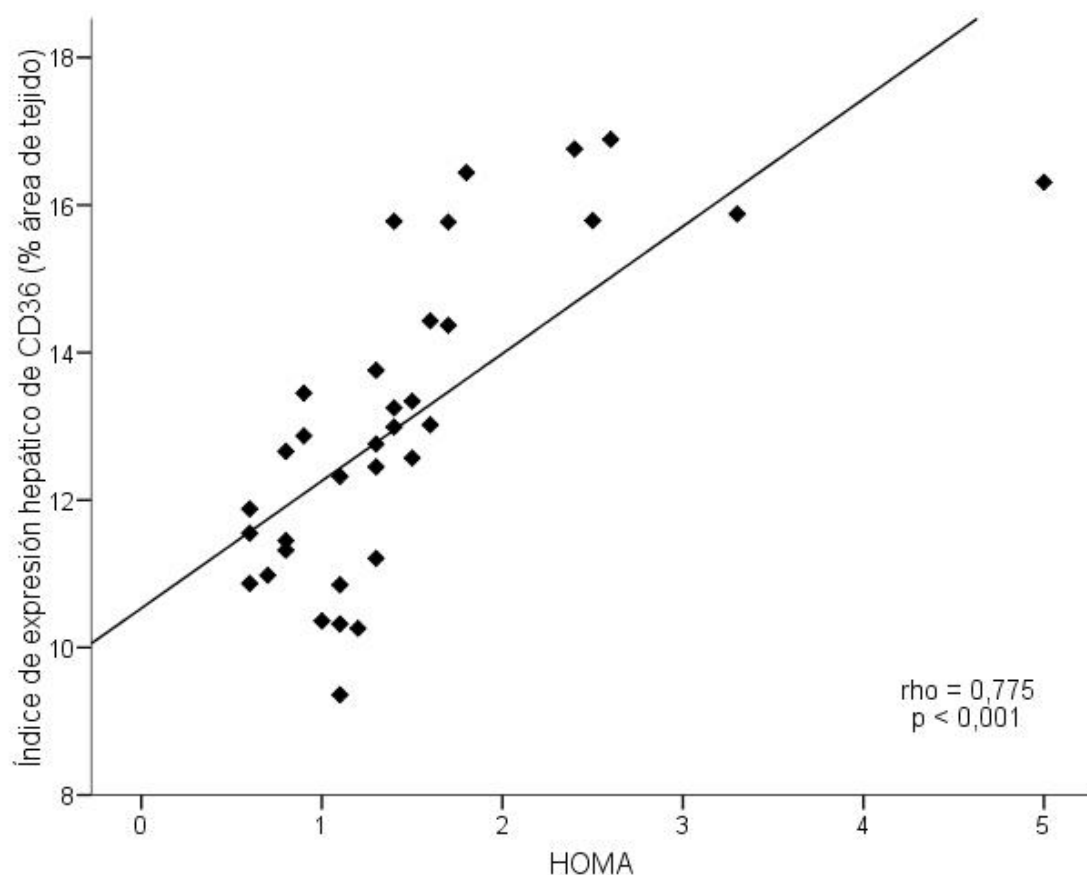


Figura 10. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en pacientes con esteatosis simple no alcohólica.

Dado que todos los pacientes con ESNA tenían esteatosis leve (grado 1), no fue posible realizar ningún análisis de correlación con el grado histológico de esteatosis. Sin embargo, para valorar mejor el impacto relativo de la esteatosis y la resistencia a la insulina en el índice de expresión hepático de CD36, se comparó este índice entre los pacientes con ESNA con y sin resistencia a la insulina (resistencia a la insulina = $\text{HOMA} \geq 2$). De esta forma, se comprobó que el índice de expresión hepático de CD36 era significativamente mayor en los pacientes con ESNA con resistencia a la insulina (mediana: 16,31 % (rango 15,79 - 16,89 %) que en aquellos sin resistencia a insulina (mediana: 12,57% (9,36 - 16,44 %); $p < 0,001$; Figura 11).

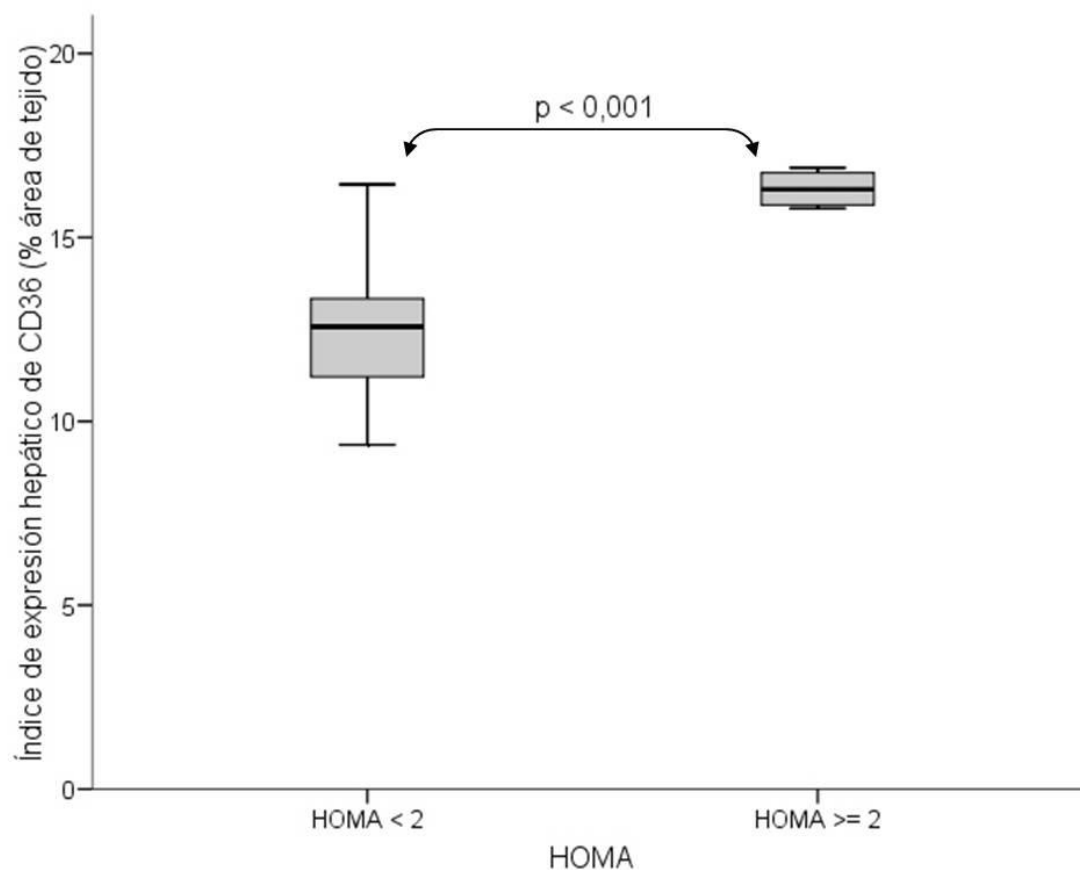


Figura 11. Índice de expresión hepático de CD36 en los pacientes con ESNA en función de la presencia de resistencia a la insulina ($\text{HOMA} \geq 2$). HOMA: Índice de resistencia a la insulina.

En los pacientes con EHNA, tampoco se encontró correlación con el IMC ($r = 0,229$; $p = 0,223$) (Figura 12), mientras que si hubo correlación positiva entre el índice de expresión hepático de CD36 y las concentraciones plasmáticas de insulina ($r = 0,663$; $p < 0,001$) (Figura 13), el índice HOMA ($r = 0,735$; $p < 0,001$) (Figura 14) y el grado histológico de esteatosis ($r = 0,711$; $p < 0,001$) (Figura 15).

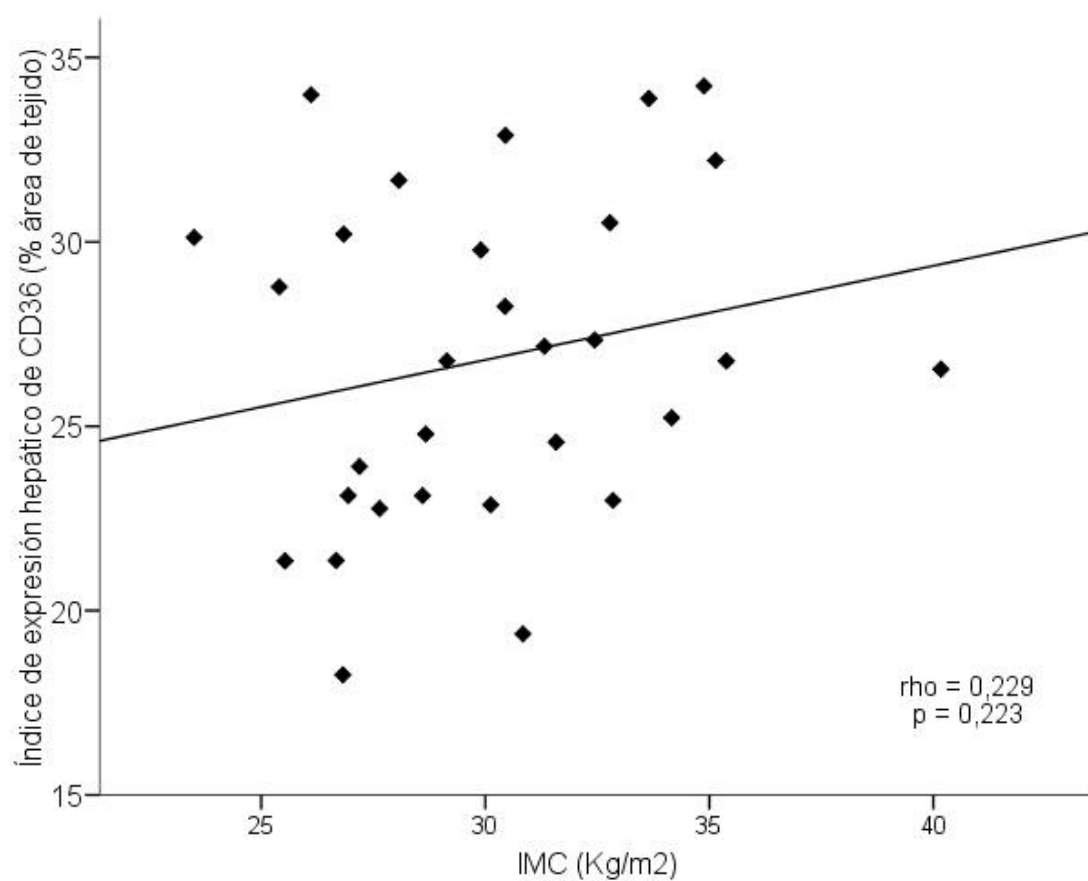


Figura 12. Ausencia de correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de masa corporal (IMC) en pacientes con EHNA.

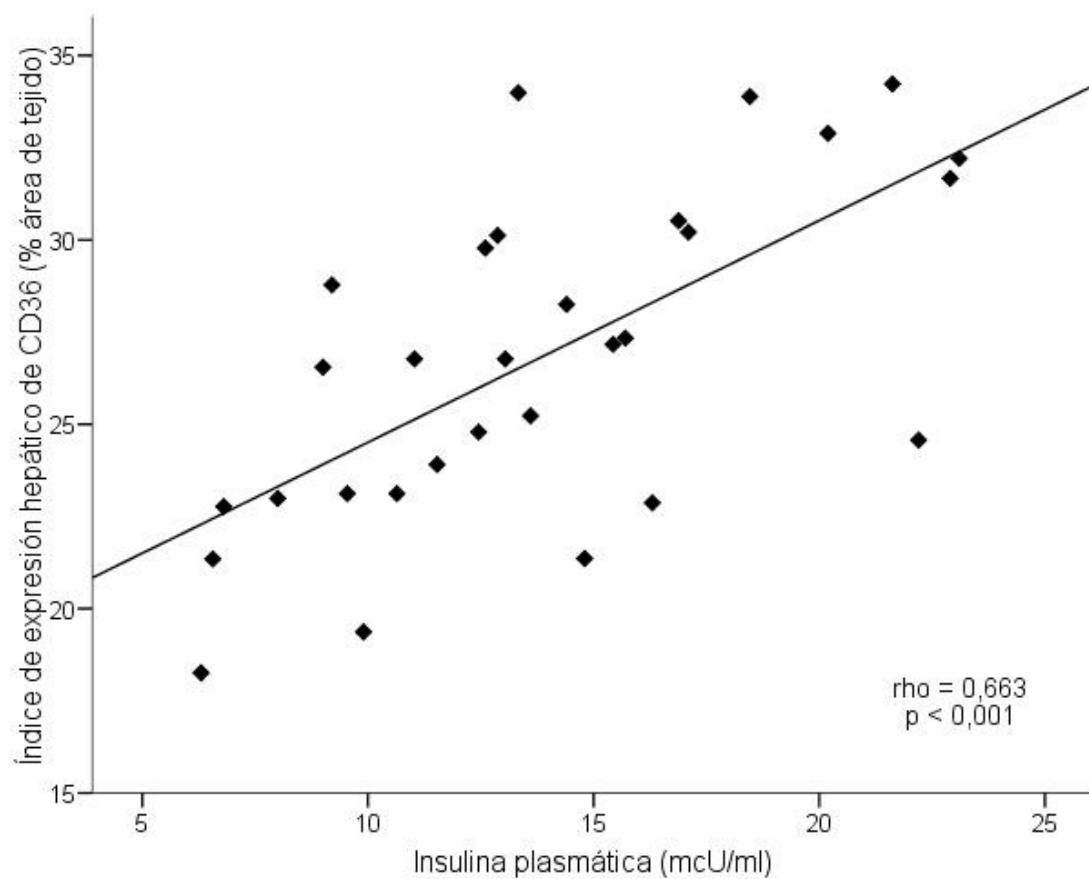


Figura 13. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y la concentración plasmática de insulina en pacientes con EHNA.

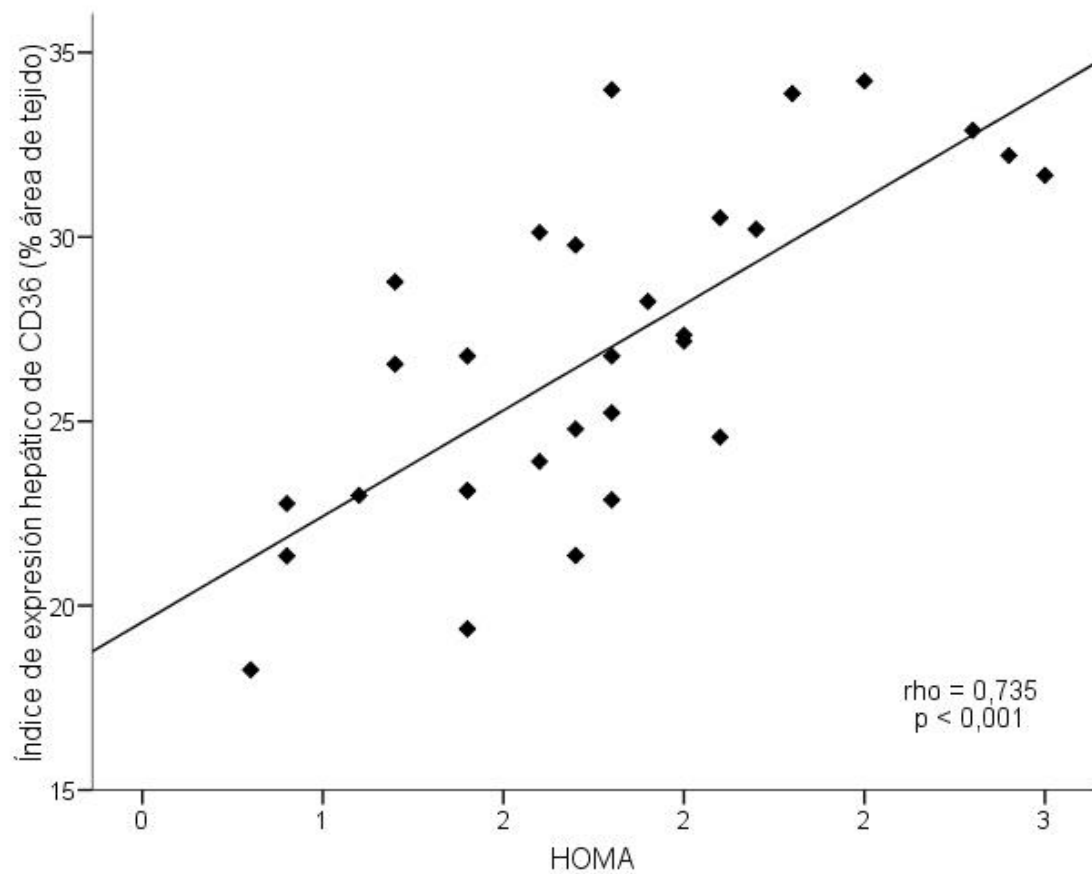


Figura 14. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en pacientes con EHNA.

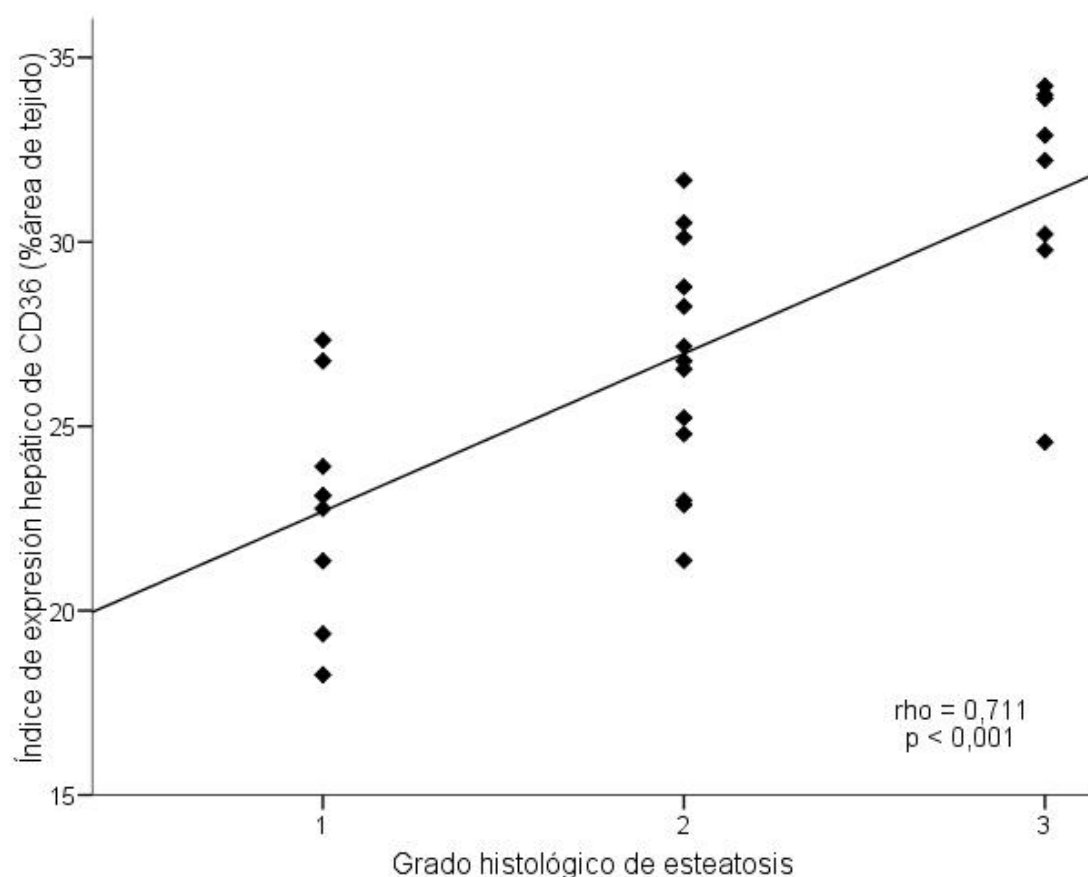


Figura 15. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el grado histológico de esteatosis en pacientes con EHNA.

En los pacientes con hepatitis VHC genotipo 1 con esteatosis se encontró una correlación positiva entre el índice de expresión hepático de CD36 y el IMC ($r = 0,661$; $p < 0,001$) (Figura 16), las concentraciones plasmáticas de insulina ($r = 0,723$; $p < 0,001$) (Figura 17) y el índice HOMA ($r=0,769$; $p < 0,001$) (Figura 18). Asimismo, en este grupo de pacientes, el índice de expresión hepático de CD36 se correlaciona significativamente con el grado histológico de la esteatosis ($r = 0,648$; $p < 0,001$) (Figura 19).

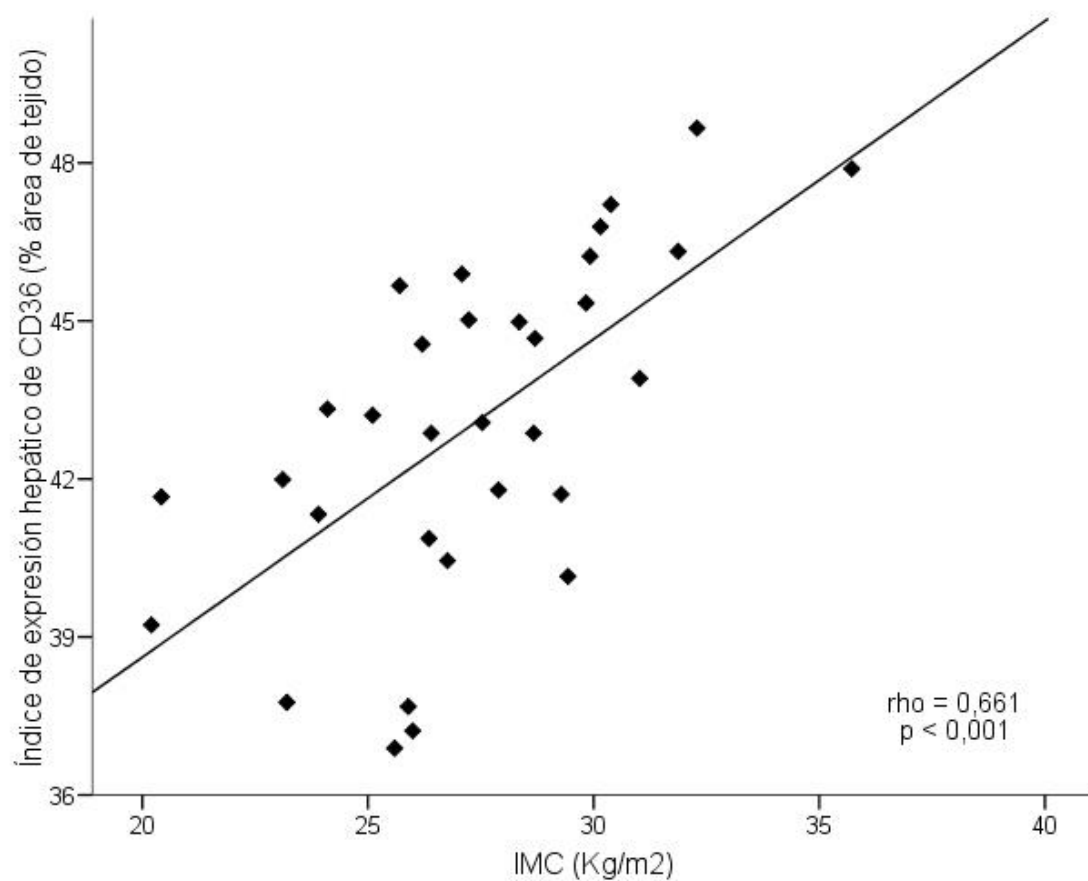


Figura 16. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el IMC en pacientes con VHC genotipo 1 y esteatosis asociada. IMC: Índice de masa corporal, VHC: Virus de la hepatitis C

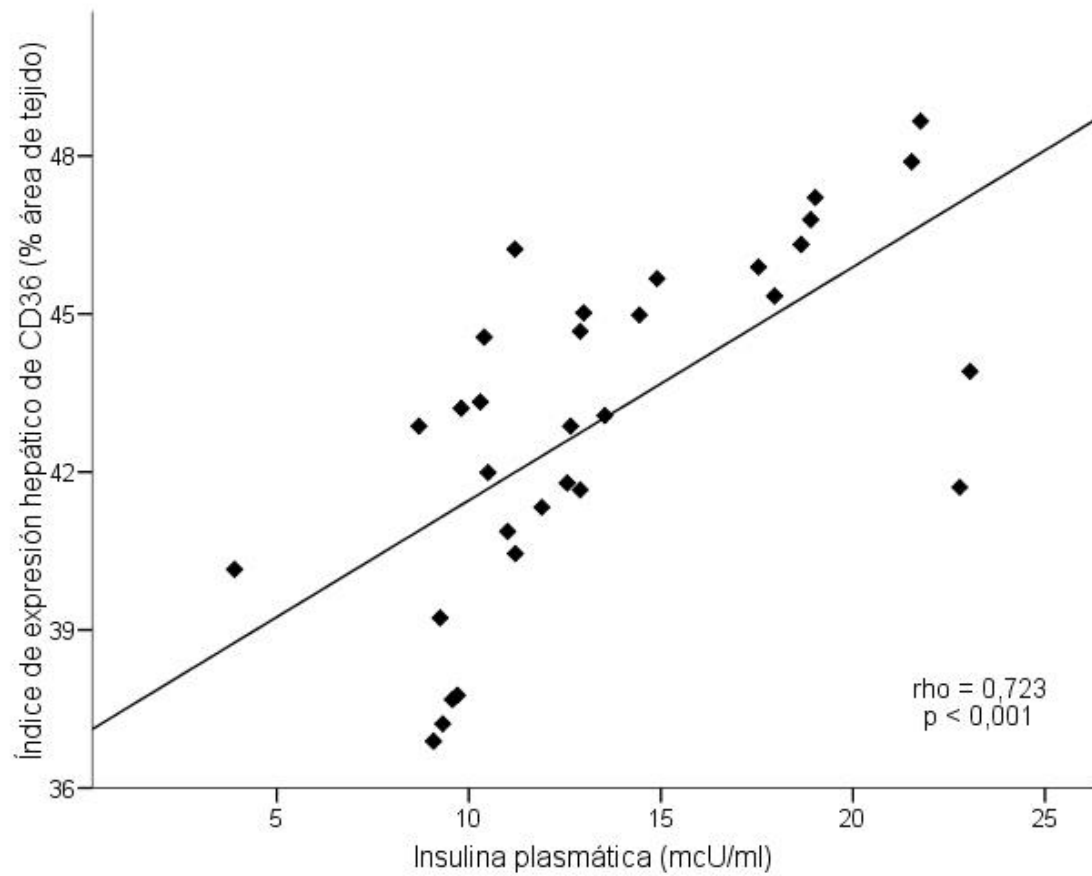


Figura 17. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y la concentración plasmática de insulina en pacientes con VHC genotipo 1 y esteatosis asociada. VHC: Virus de la hepatitis C.

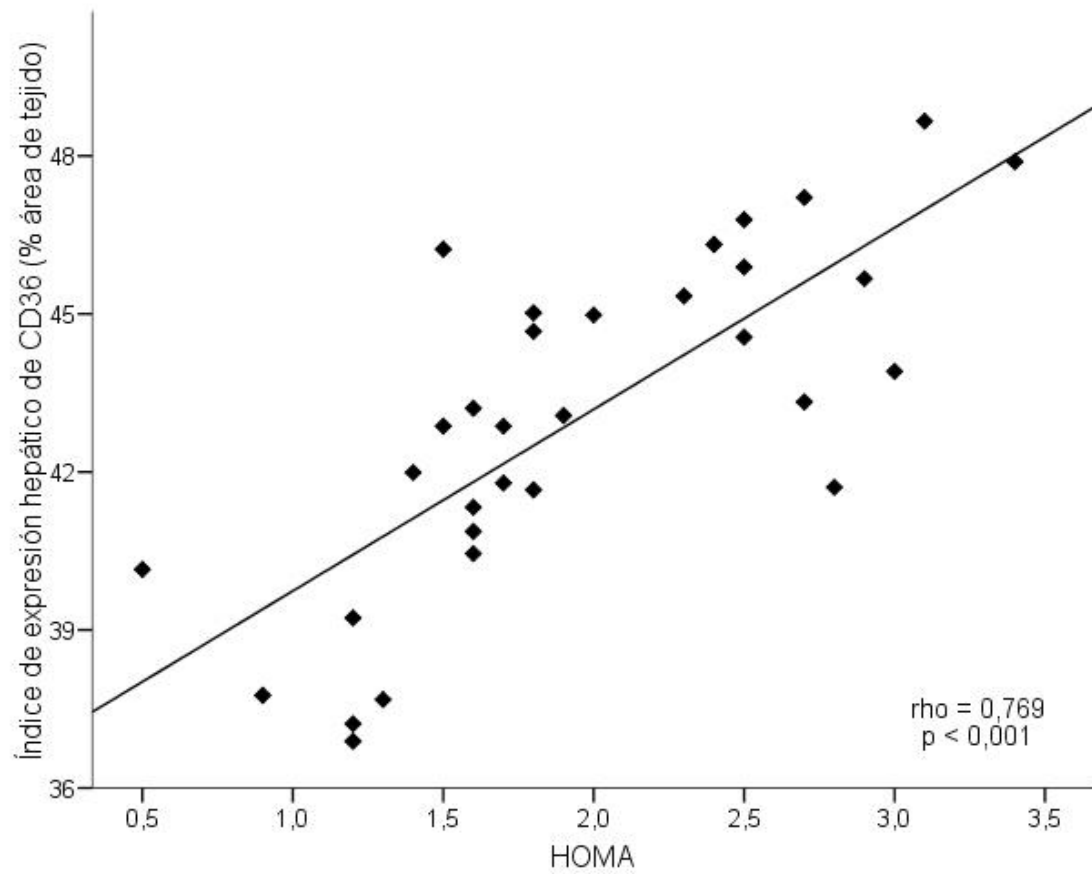


Figura 18. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en pacientes con VHC genotipo 1 y esteatosis asociada. VHC: Virus de la hepatitis C.

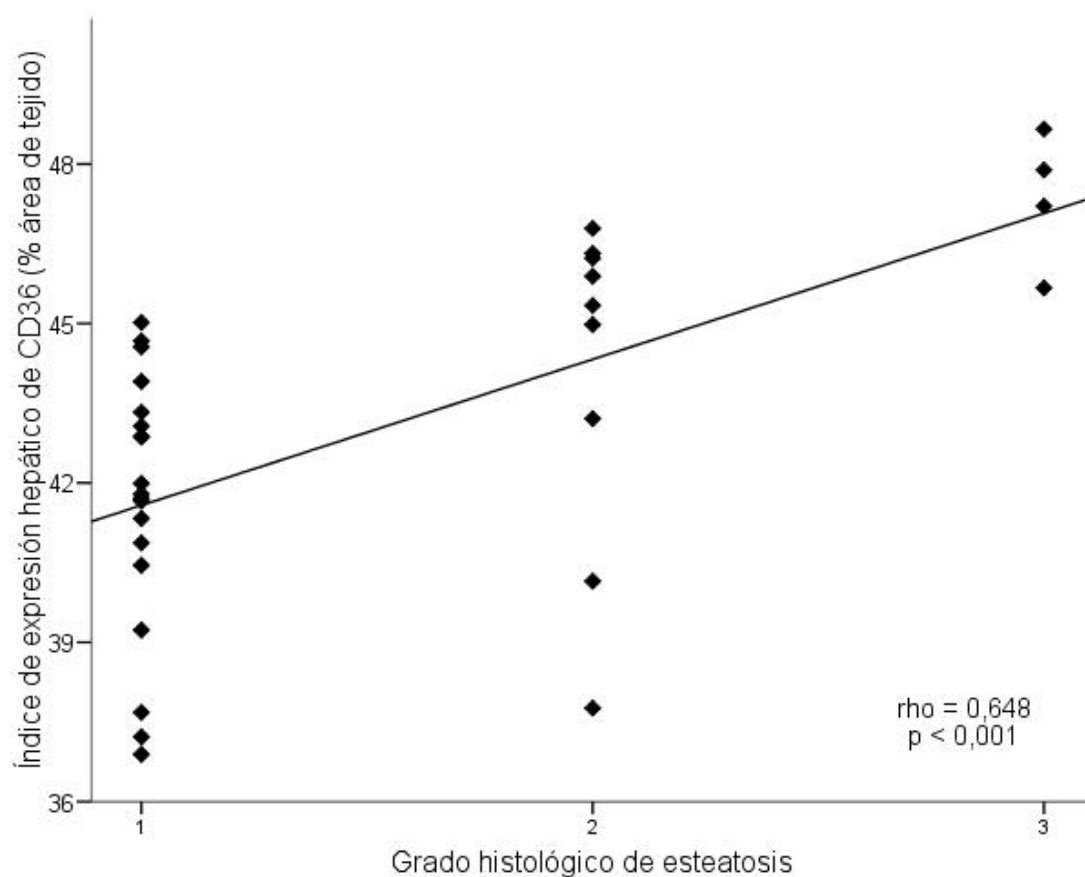


Figura 19. Correlación entre el índice de expresión hepática de CD36 y el grado histológico de esteatosis en pacientes con VHC genotipo 1 y esteatosis asociada. VHC: Virus de la hepatitis C.

También se observó una correlación positiva, aunque en menor medida, en los pacientes con hepatitis crónica por VHC genotipo 1 sin esteatosis con el IMC ($r = 0,342$; $p = 0,048$) (Figura 20), las concentraciones plasmáticas de insulina ($r=0,446$; $p = 0,008$) (Figura 21) y el índice HOMA ($r = 0,653$; $p < 0,001$) (Figura 22).

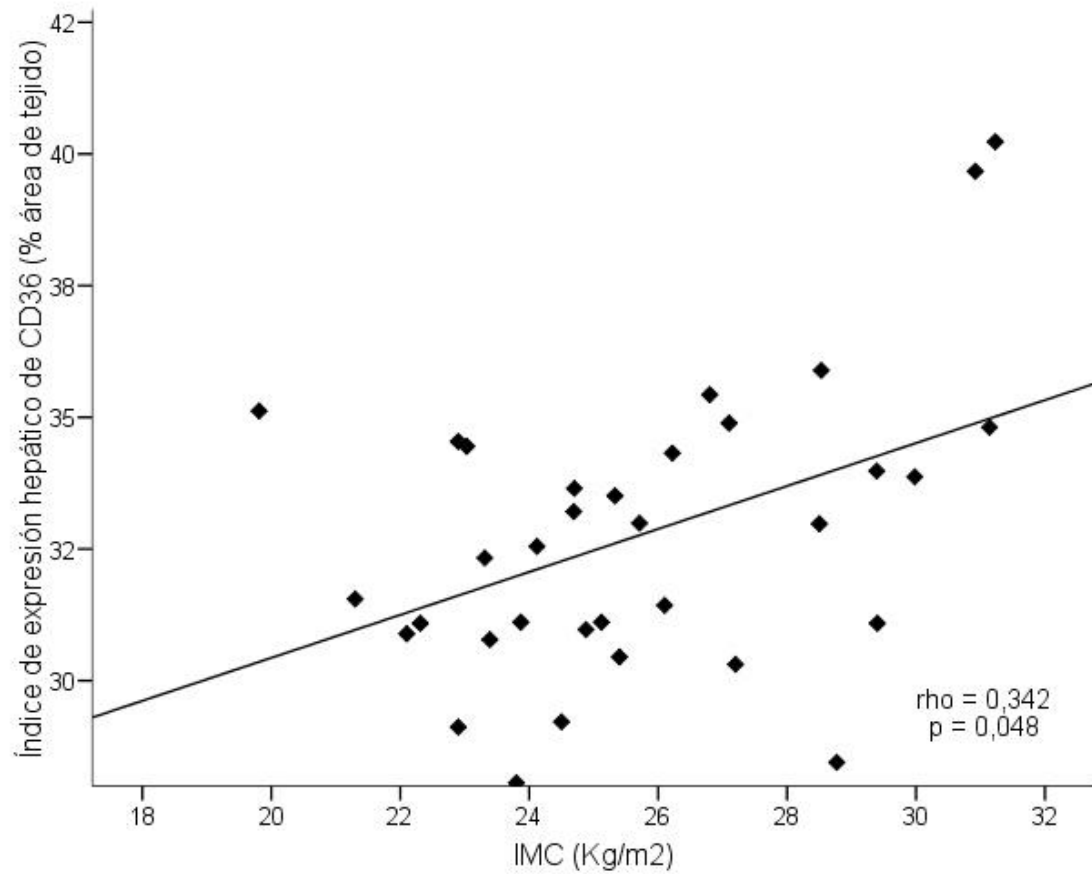


Figura 20. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de masa corporal (IMC) en pacientes con VHC genotipo 1 sin esteatosis asociada. VHC: Virus de la hepatitis C.

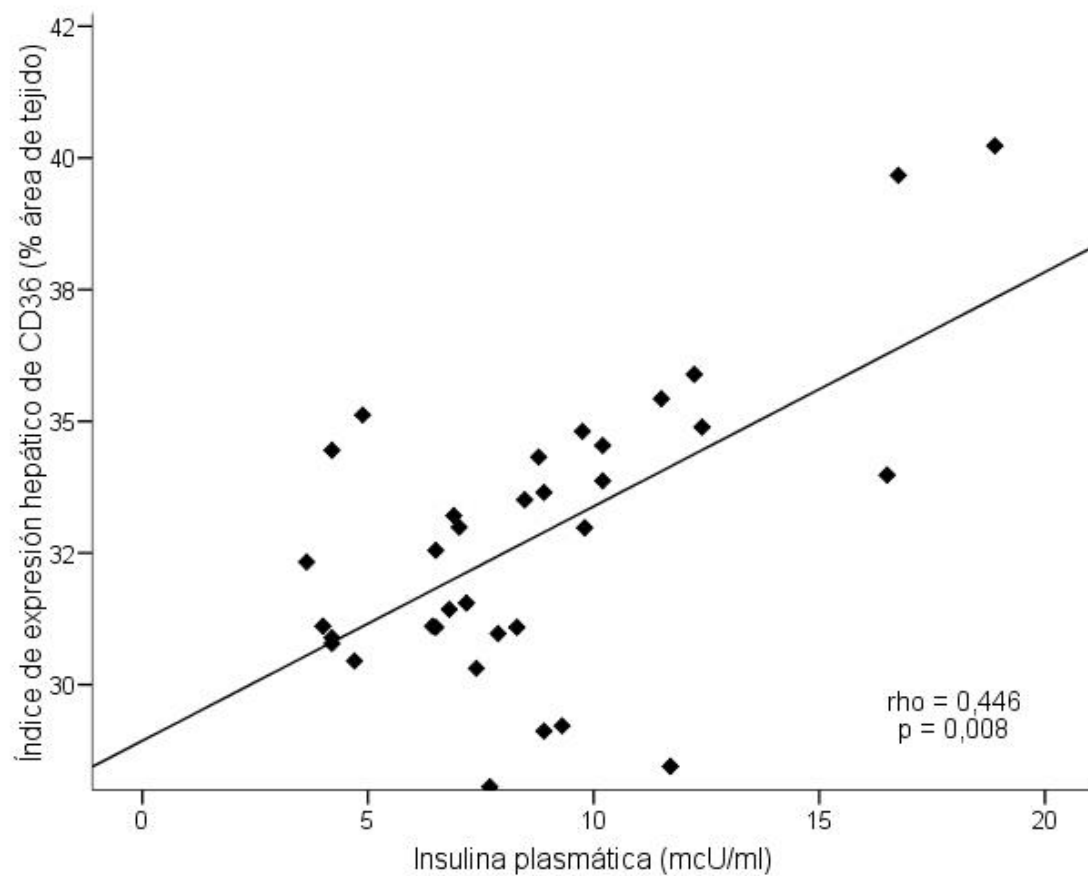


Figura 21. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y la concentración plasmática de insulina en pacientes con VHC genotipo 1 sin esteatosis asociada. VHC: Virus de la hepatitis C.

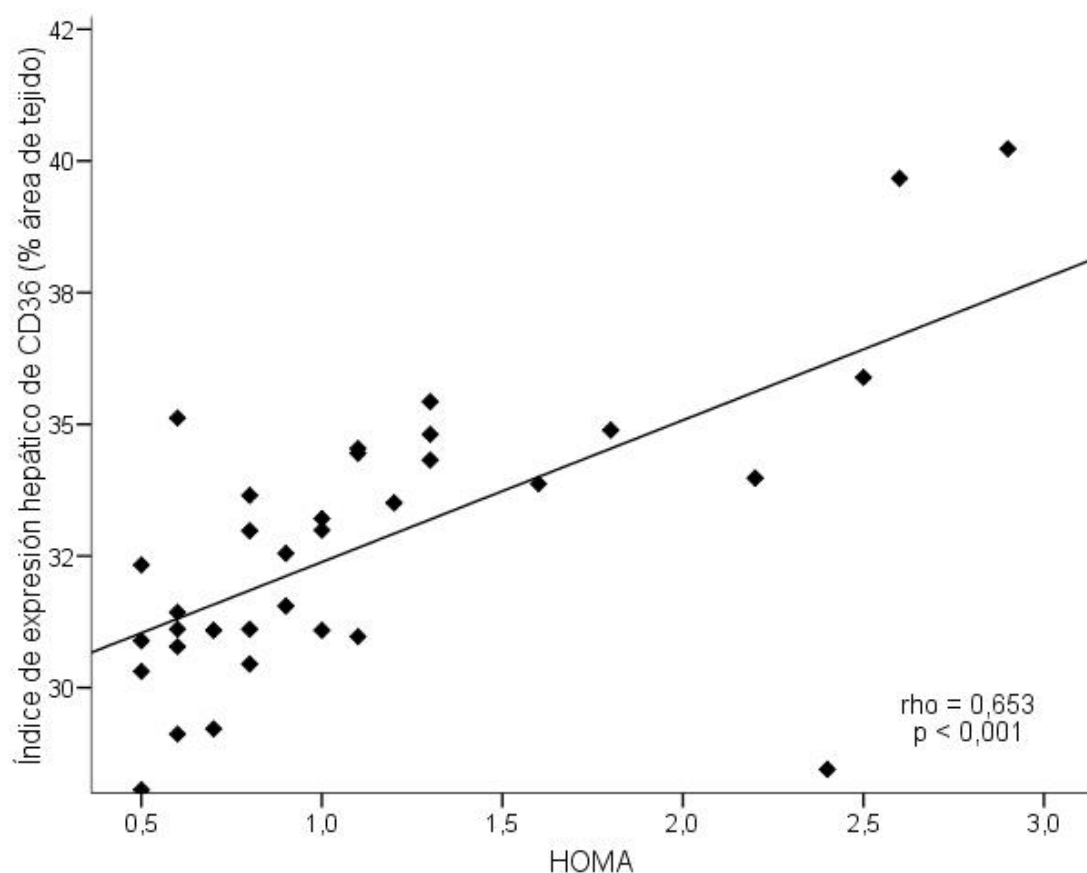


Figura 22. Correlación entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en pacientes con VHC genotipo 1 sin esteatosis asociada. VHC: Virus de la hepatitis C.

2. ESTUDIOS EN SUERO

Una vez comprobada la expresión hepática de CD36 y su correlación con la esteatosis, el siguiente paso fue cuantificar las concentraciones de CD36s en suero. Para este estudio se incluyeron 314 pacientes, 227 con EHGNA y 87 con hepatitis crónica por VHC genotipos 1 y 2, así como 85 sujetos con histología hepática normal.

2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y CONTROLES SANOS

Las características clínicas e histológicas de los pacientes y controles sanos incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 5 y en la Tabla 6.

Tabla 5. Características de la población con enfermedad hepática grasa no alcohólica y con hígado normal incluida en el estudio serológico

| Características | HN | ESNA | EHNA |
|--------------------------|---------------|------------------------------|----------------------------|
| Número | 85 | 172 | 55 |
| Edad (años) | 47,9 ± 13,8 | 45,9 ± 11,8 | 49,6 ± 12,8 |
| Sexo (Hombre/Mujer) | (12/73) | (47/125) | (19/36) |
| % Mujeres | 85,9 % | 72,7 % | 65,5 % |
| IMC (kg/m ²) | 27,2 ± 4,6 | 40,9 ± 10,8 * | 34,1 ± 10,0 * [#] |
| < 25 | 30 (35,3%) | 8 (4,6%) | 3 (5,4%) |
| 25,1 – 29,9 | 35 (41,2%) | 30 (17,4%) | 18 (32,7%) |
| 30 – 30,9 | 19 (22,3%) | 29 (16,9%) | 19 (34,6%) |
| > 40 | 1 (1,2%) | 105 (65,1%) | 15 (27,3%) |
| Glucosa (mg/dL) | 93,4 ± 18,4 | 113,6 ± 46,4 * [#] | 100,2 ± 22,5 |
| Insulina (μU/L) | 7,3 ± 4,1 | 12,3 ± 9,7 * | 12,9 ± 8,9 |
| HOMA | 0,96 ± 0,53 | 1,73 ± 1,54 * | 1,81 ± 1,37 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 109,3 ± 49,2 | 152,9 ± 77,7 * | 144,6 ± 61,6 |
| Colesterol-HDL (mg/dL) | 48,7 ± 9,9 | 44,4 ± 15,1 * | 46,8 ± 12,2 |
| Síndrome metabólico | 4 (4,7%) | 90 (52,3%) * | 25 (45,5%) |
| ALT (UI/L) | 16,8 ± 7,1 | 35,8 ± 25,1 * | 41,7 ± 34,0 |
| AST (UI/L) | 17,2 ± 4,3 | 24,7 ± 11,5 * [#] | 34,6 ± 33,6 |
| GGT (UI/L) | 30,6 ± 29,6 | 47,6 ± 50,1 * [#] | 69,7 ± 69,9 |
| CD36s (pg/ml) | 173,9 ± 137,4 | 361,4 ± 286,4 * [#] | 229,6 ± 202,5 |
| Esteatosis (%) | | | |
| Grado 0 | 85 (100 %) | | |
| Grado 1 | | 92 (53,5 %) | 39 (70,9 %) |
| Grado 2 | | 55 (32,0 %) | 10 (18,2 %) |
| Grado 3 | | 25 (14,5 %) | 6 (10,9 %) |
| Fibrosis (%) | | | |
| Estadio 0 | 85 (100 %) | 172 (100 %) | 3 (5,5 %) |
| Estadio 1 | | | 42 (76,4 %) |
| Estadio 2 | | | 7 (12,7 %) |
| Estadio 3 | | | 3 (5,5 %) |
| Grado de actividad (%) | | | |
| Grado 0 | 85 (100 %) | 172 (100 %) | |
| Grado 1 | | | 27 (49,1 %) |
| Grado 2 | | | 21 (38,2 %) |
| Grado 3 | | | 7 (12,7 %) |

HN: Hígado normal. ESNA: Esteatosis simple no alcohólica. EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica. IMC: Índice de masa corporal. HOMA: Índice de resistencia a la insulina. HDL: Lipoproteína de alta densidad. ALT: Alanino aminotransferasa. AST: Aspartato aminotransferasa. GGT: Gamma-glutamiltanspeptidasa. CD36s: CD36 soluble en suero. Diferencias significativas entre grupos: * p < 0,05 vs HN, [#] p < 0,05 ESNA vs EHNA

Tabla 6. Características de los pacientes con hepatitis crónica por virus C genotipos 1 y 2 incluidos en el estudio serológico

| Características | VHC | VHC + ESNA |
|--------------------------|-----------------|-----------------|
| Número | 38 | 49 |
| Edad (años) | 45,5 ± 10,2 | 46,1 ± 9,4 |
| Sexo (Hombre/Mujer) | (25/13) | (30/19) |
| % Mujeres | 34,2 % | 38,8 % |
| IMC (kg/m ²) | 24,2 ± 2,8 * \$ | 27,1 ± 3,5 |
| < 25 | 23 (60,5 %) | 12 (24,5 %) |
| 25,1 – 29,9 | 15 (39,5 %) | 21 (42,8 %) |
| 30 – 30,9 | 0 | 9 (18,4 %) |
| > 40 | 0 | 7 (14,3 %) |
| Glucosa (mg/dL) | 89,4 ± 11,1 | 89,2 ± 15,8 |
| Insulina (μU/L) | 9,4 ± 4,3 * \$ | 12,5 ± 7,4 * |
| HOMA | 2,06 ± 1,14 * | 2,67 ± 7,4 * |
| Triglicéridos (mg/dL) | 80,5 ± 34,7 * | 89,4 ± 41,6 * |
| Colesterol-HDL (mg/dL) | 49,5 ± 12,7 | 52,7 ± 14,6 |
| Síndrome metabólico | 2 (5,3%) | 4 (8,2%) |
| ALT (UI/L) | 91,1 ± 84,6 * | 85,7 ± 71,8 * |
| AST (UI/L) | 54,7 ± 44,1 * | 54,9 ± 36,9 * |
| GGT (UI/L) | 47,6 ± 27,7 * | 63,4 ± 61,7 * |
| CD36s (pg/ml) | 428,7 ± 260,3 * | 387,2 ± 283,6 * |
| Genotipo 1 (%) | 29 (76,3 %) | 38 (77,3 %) |
| Genotipo 2 (%) | 9 (23,7 %) | 11 (22,4 %) |
| Esteatosis (%) | | |
| Grado 0 | 38 (100 %) | |
| Grado 1 | | 39 (79,6 %) |
| Grado 2 | | 7 (14,3 %) |
| Grado 3 | | 3 (6,1 %) |
| Fibrosis (%) | | |
| Estadio 0 | 10 (26,3 %) | 11 (22,4 %) |
| Estadio 1 | 17 (44,7 %) | 12 (24,5 %) |
| Estadio 2 | 5 (13,2 %) | 14 (28,8 %) |
| Estadio 3 | 5 (13,2 %) | 11 (22,4 %) |
| Estadio 4 | 1 (2,6 %) | 1 (2,0 %) |
| Grado de actividad (%) | | |
| Grado 0 | 1 (2,6 %) | 1 (2,0 %) |
| Grado 1 | 7 (18,4 %) | 10 (20,4 %) |
| Grado 2 | 22 (57,9 %) | 29 (59,2 %) |
| Grado 3 | 8 (21,1 %) | 9 (18,4 %) |

VHC: Virus de la hepatitis C. VHC+ESNA: Virus de la hepatitis C con esteatosis asociada. IMC: Índice de masa corporal. HOMA: Índice de resistencia a la insulina. HDL: Lipoproteína de alta densidad. ALT: Alanino aminotransferasa. AST: Aspartato aminotransferasa. GGT: Gamma-glutamiltanspeptidasa. CD36s: CD36 soluble en suero.

Diferencias significativas entre grupos: * p < 0,05 vs HN, \$ p < 0,05 VHC vs VHC+ESNA.

Un hecho destacable es que los diferentes grupos de pacientes y el grupo control con HN eran comparables en términos de edad. Las mujeres eran predominantes en el grupo de pacientes con EHGNA y en el grupo con HN, mientras que los hombres fueron más frecuentes en la cohorte de pacientes con hepatitis crónica por VHC. Otro aspecto a destacar es que la media del IMC fue significativamente mayor en los pacientes con EHGNA que en los sujetos con HN y también con respecto al grupo de pacientes con hepatitis crónica por VHC ($p < 0,05$, respectivamente).

Respecto a las características histológicas de los pacientes con EHGNA, hay que resaltar que la mayoría (172 pacientes: 75,8%) tenían ESNA mientras que 55 pacientes (24,2%) fueron diagnosticados histológicamente de EHNA. Un hecho a destacar es que el 42,3% de los pacientes con EHGNA tenían esteatosis avanzada (grado de esteatosis ≥ 2).

Los pacientes con hepatitis crónica por VHC se clasificaron en 2 grupos en función de la presencia o ausencia de esteatosis en la biopsia hepática. La esteatosis estaba presente en 49 (56,3%) de los pacientes con hepatitis crónica por VHC, de los cuales el 20,4% tenían esteatosis avanzada (grado de esteatosis ≥ 2). No se encontraron diferencias significativas en el grado de necroinflamación y el estadio de fibrosis entre los pacientes con hepatitis crónica por VHC con o sin esteatosis asociada.

2.2. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE CD36 SOLUBLE SEGÚN EL DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

La concentración media de CD36s fue significativamente mayor en el suero de los pacientes con ESNA que en el de los sujetos con HN ($361,4 \pm 286,4$ pg/ml vs $173,9 \pm 137,4$ pg/ml, respectivamente, $p < 0,001$; Figura 23), pero no en el suero de los pacientes con EHNA ($229,6 \pm 202,5$ pg/ml) en comparación con el grupo HN ($p = 0,153$; Figura 23). Un hallazgo interesante es que las concentraciones séricas de CD36s fueron significativamente más elevadas en los pacientes con ESNA que en aquellos con EHNA ($p = 0,001$; Figura 23). Por otro lado, los valores de CD36s en el suero también fueron

significativamente mayores en los pacientes con hepatitis crónica por VHC sin esteatosis ($428,7 \pm 260,3$ pg/ml) y en aquellos con esteatosis asociada ($387,2 \pm 283,6$ pg/ml) que en los individuos con HN ($173,9 \pm 137,4$ pg/ml; $p < 0,001$ en ambos casos; Figura 23). Curiosamente, no hubo diferencias significativas en las concentraciones séricas de CD36s entre los pacientes con hepatitis crónica por VHC con o sin esteatosis concomitante ($p = 0,173$; Figura 23).

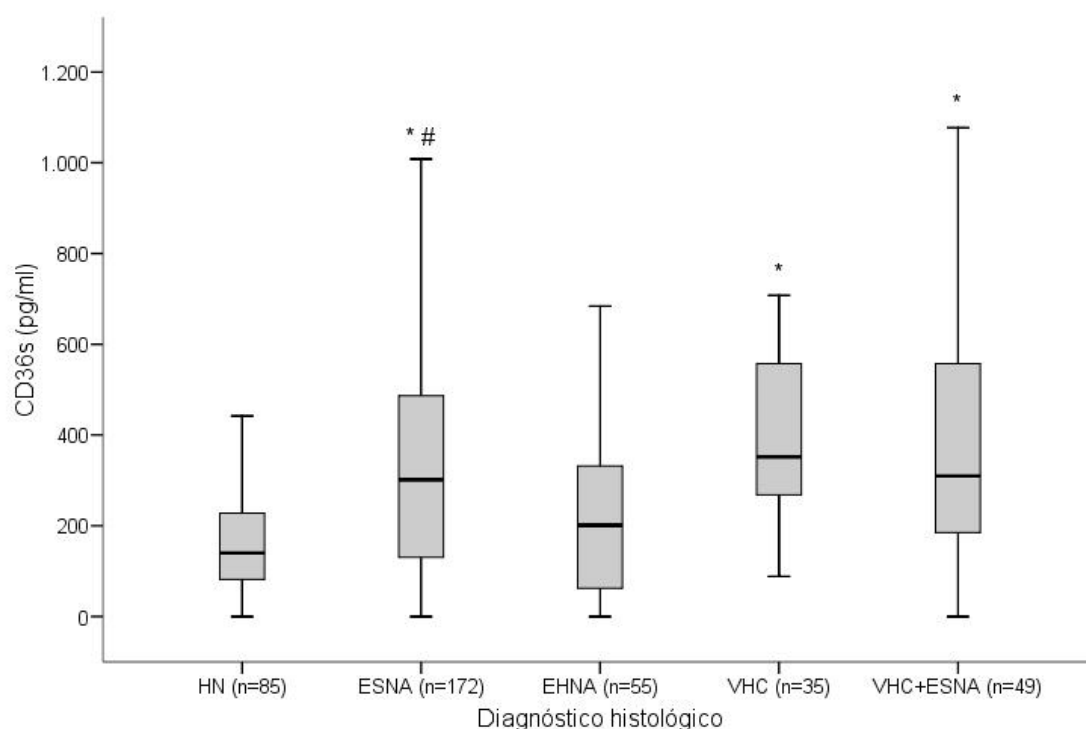


Figura 23. Las concentraciones séricas de CD36s varían en función del diagnóstico histológico. HN: Hígado normal. ESNA: Esteatosis simple no alcohólica. EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica. VHC: Hepatitis virus C genotipo 1. VHC+ESNA: Hepatitis virus C genotipo 1 con esteatosis simple no alcohólica. CD36s: CD36 soluble en suero. Diferencias significativas entre grupos: * $p < 0,001$ vs HN; # $p < 0,001$ vs EHNA.

2.3. CORRELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE CD36 SOLUBLE Y PARÁMETROS METABÓLICOS E HISTOLÓGICOS

Se encontró un aumento significativo y progresivo en las concentraciones de CD36s en el suero de los pacientes con EHGNA en relación con el grado histológico de esteatosis ($p < 0,001$; Figura 24), pero esta tendencia no se observó en los pacientes con hepatitis crónica por VHC ($p = 0,151$; Figura 25).

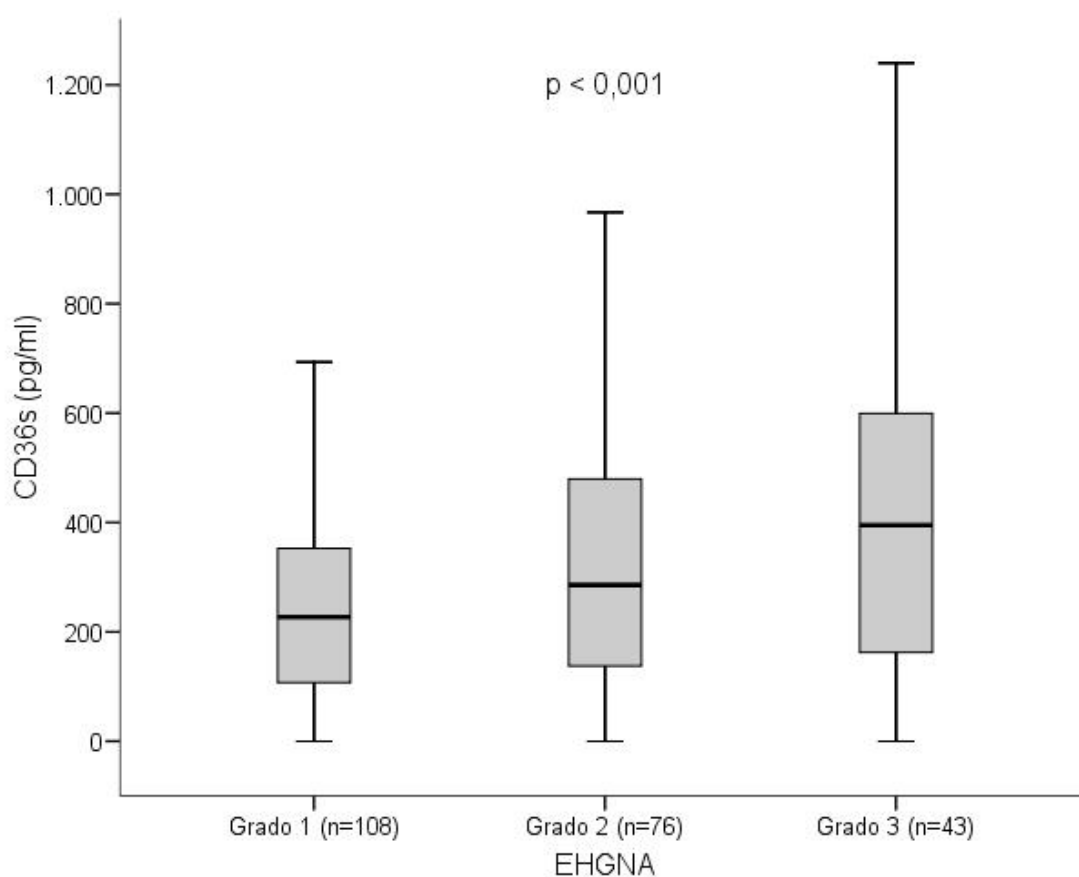


Figura 24. Las concentraciones séricas de CD36s aumentan de manera progresiva en paralelo con el grado de esteatosis en los pacientes con EHGNA (n=227). CD36s: CD36 soluble. EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

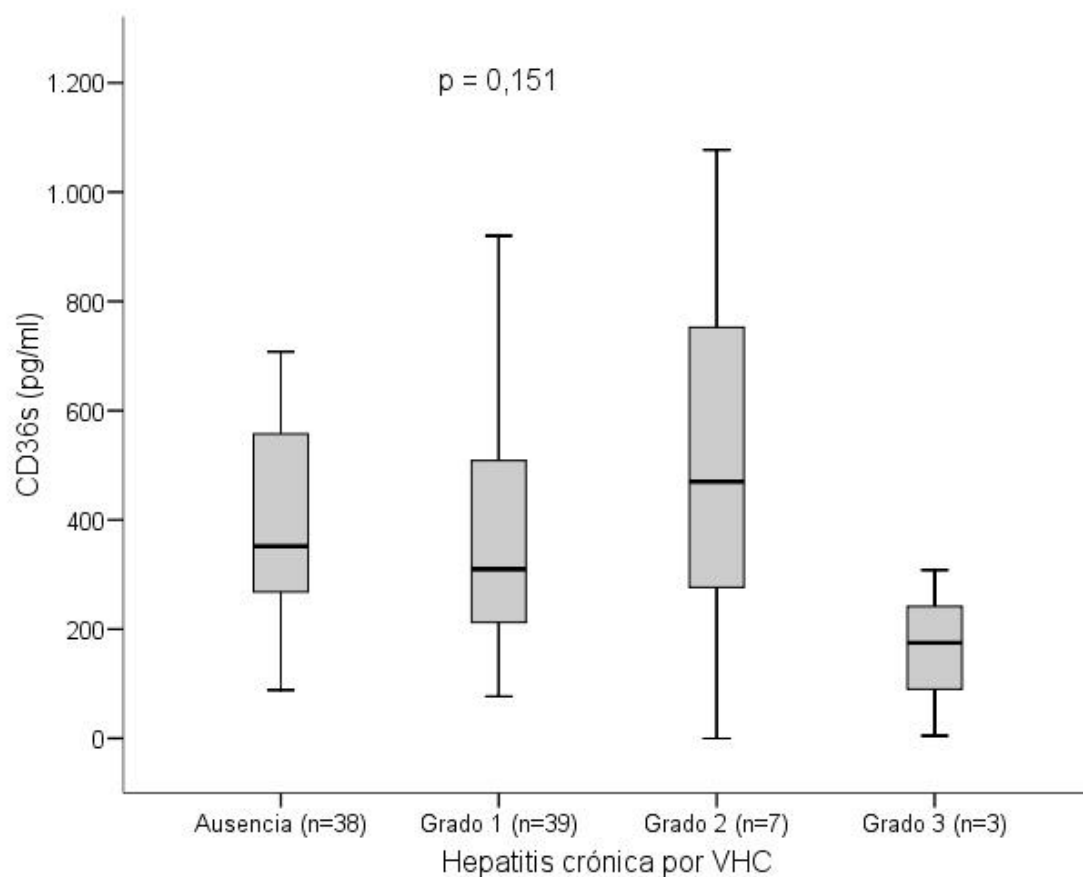


Figura 25. Las concentraciones séricas de CD36s no se modifican significativamente en función del grado de esteatosis en los pacientes con hepatitis crónica por VHC. CD36s: CD36 soluble. VHC: Virus de la hepatitis C.

Por otra parte, en la cohorte de pacientes con EHGNA, se encontró una correlación positiva entre las concentraciones séricas de CD36s y el IMC ($\rho = 0,389$, $p < 0,001$; Figura 26), los niveles de insulina en plasma ($\rho = 0,151$, $p = 0,024$; Figura 27) y el índice HOMA ($\rho = 0,161$, $p = 0,016$; Figura 28).

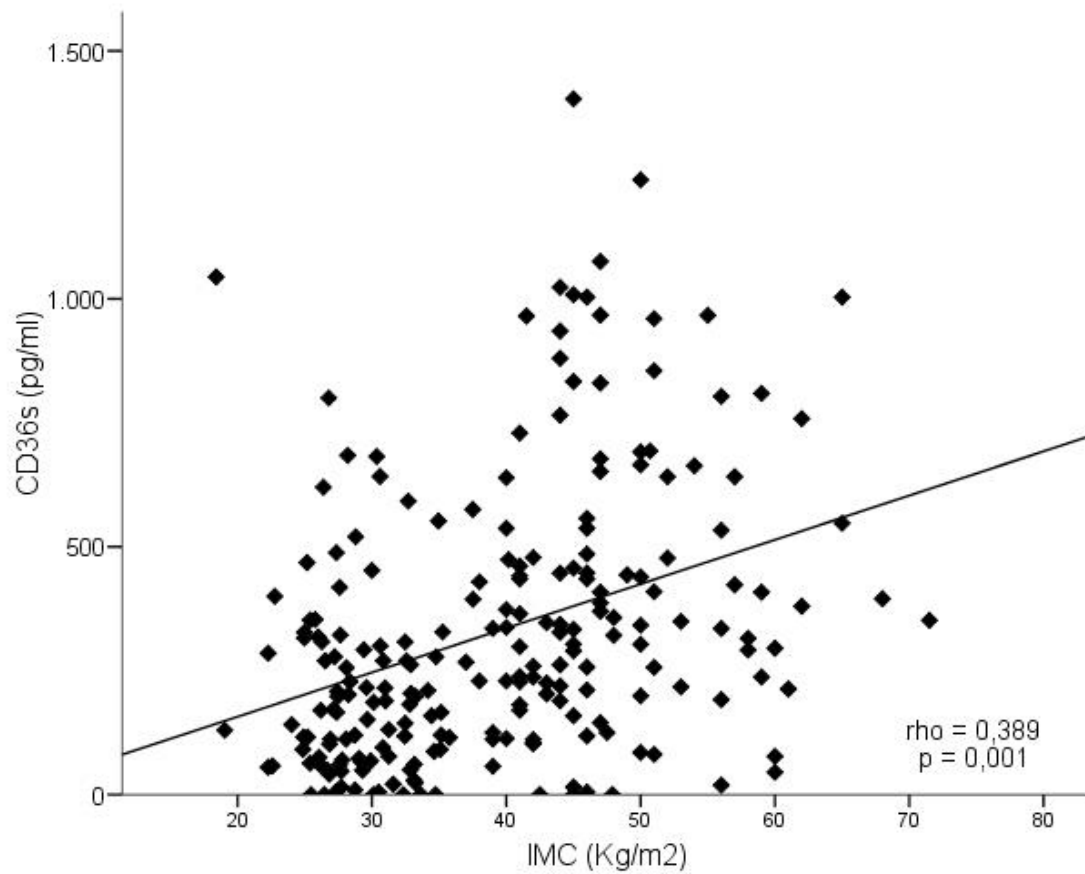


Figura 26. Las concentraciones séricas de CD36s se correlacionan positivamente con el índice de masa corporal (IMC) en los pacientes con EHGNA (n=227). EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

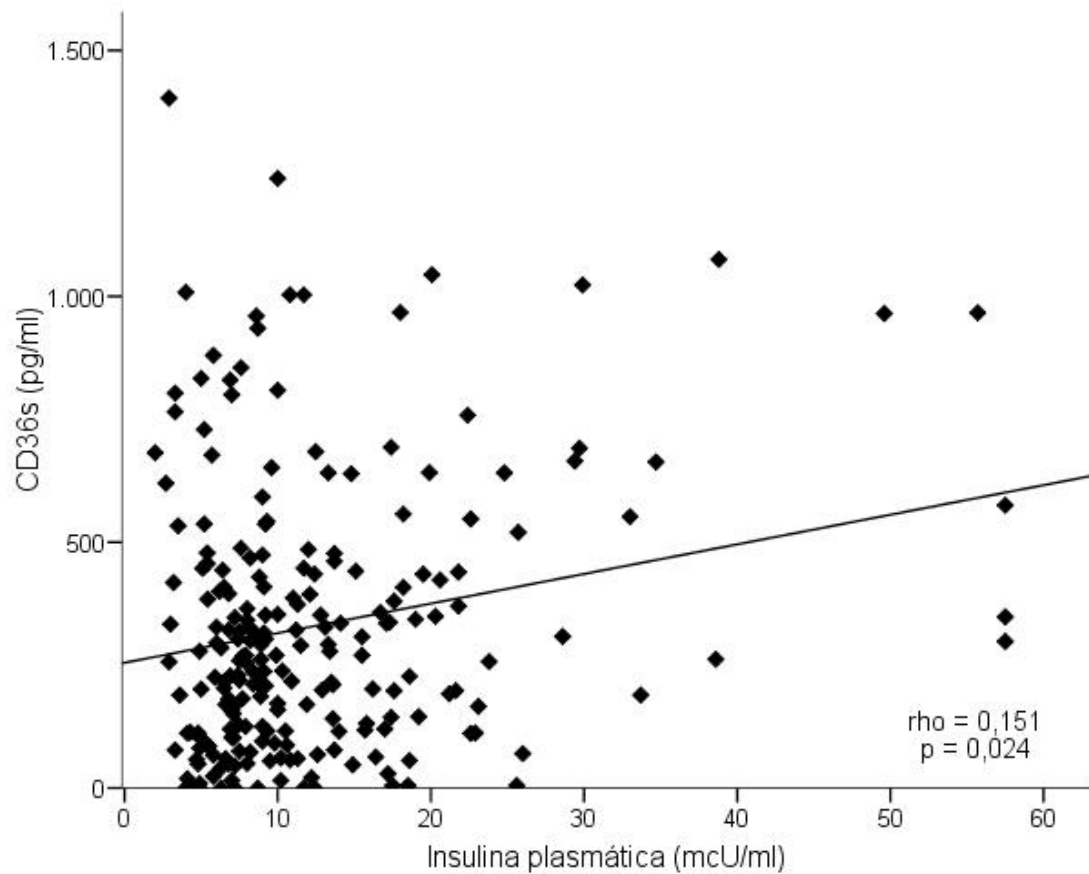


Figura 27. Las concentraciones séricas de CD36s se correlacionan positivamente con la insulina plasmática en los pacientes con EHGA (n=227). CD36s: CD36 soluble. EHGA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

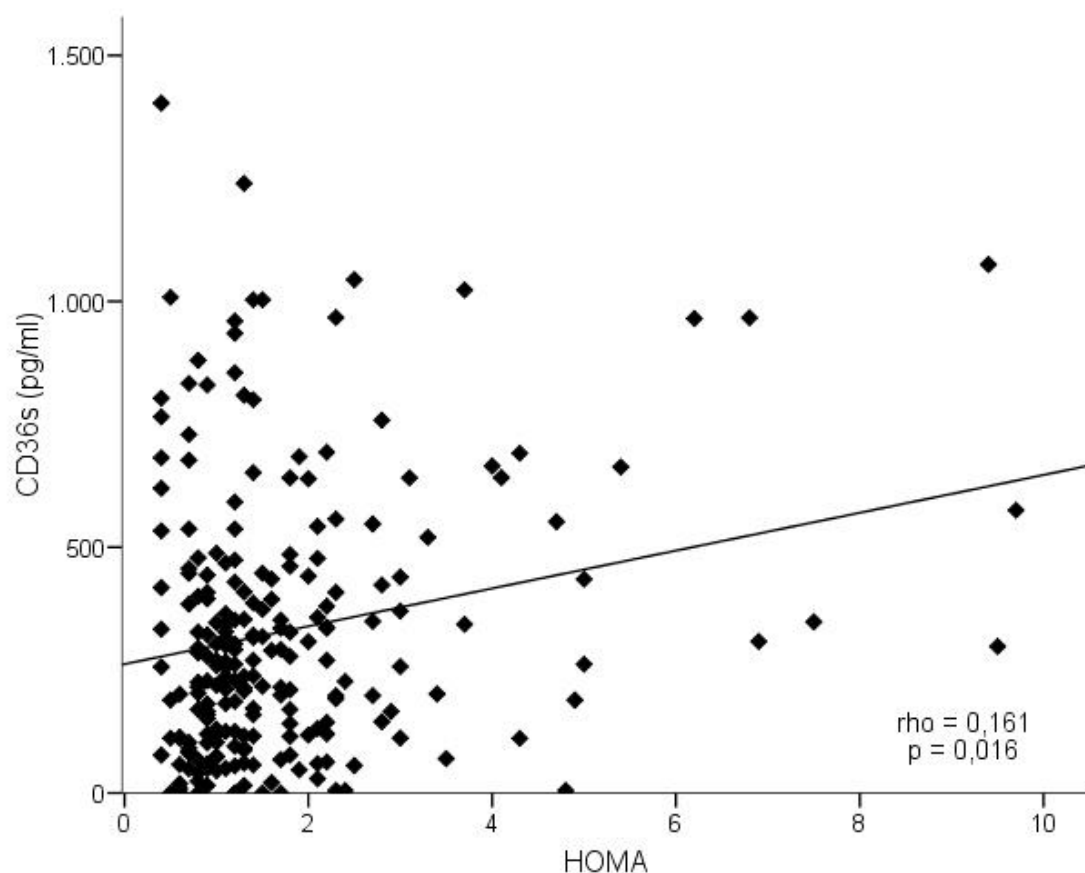


Figura 28. Las concentraciones séricas de CD36s se correlacionan positivamente con el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en los pacientes con EHGNA (n=227). CD36s: CD36 soluble. EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica.

Por el contrario, en el grupo de pacientes con hepatitis crónica por VHC, no se observó ninguna relación entre los valores séricos de CD36s y el IMC ($\rho = 0,021$; $p = 0,896$; Figura 29), la insulina en plasma (valores $\rho = 0,100$, $p = 0,386$; Figura 30) y el índice HOMA ($\rho = 0,145$, $p = 0,208$; Figura 31). Finalmente, no se encontró una correlación entre los valores séricos de CD36s y el grado de actividad necroinflamatoria y el estadio de fibrosis tanto en los pacientes con EHGNA ($p = 0,176$ y $p = 0,310$; respectivamente, no se muestran los datos) como en los pacientes con hepatitis crónica VHC ($p = 0,249$ y $p = 0,538$; respectivamente, no se muestran los datos).

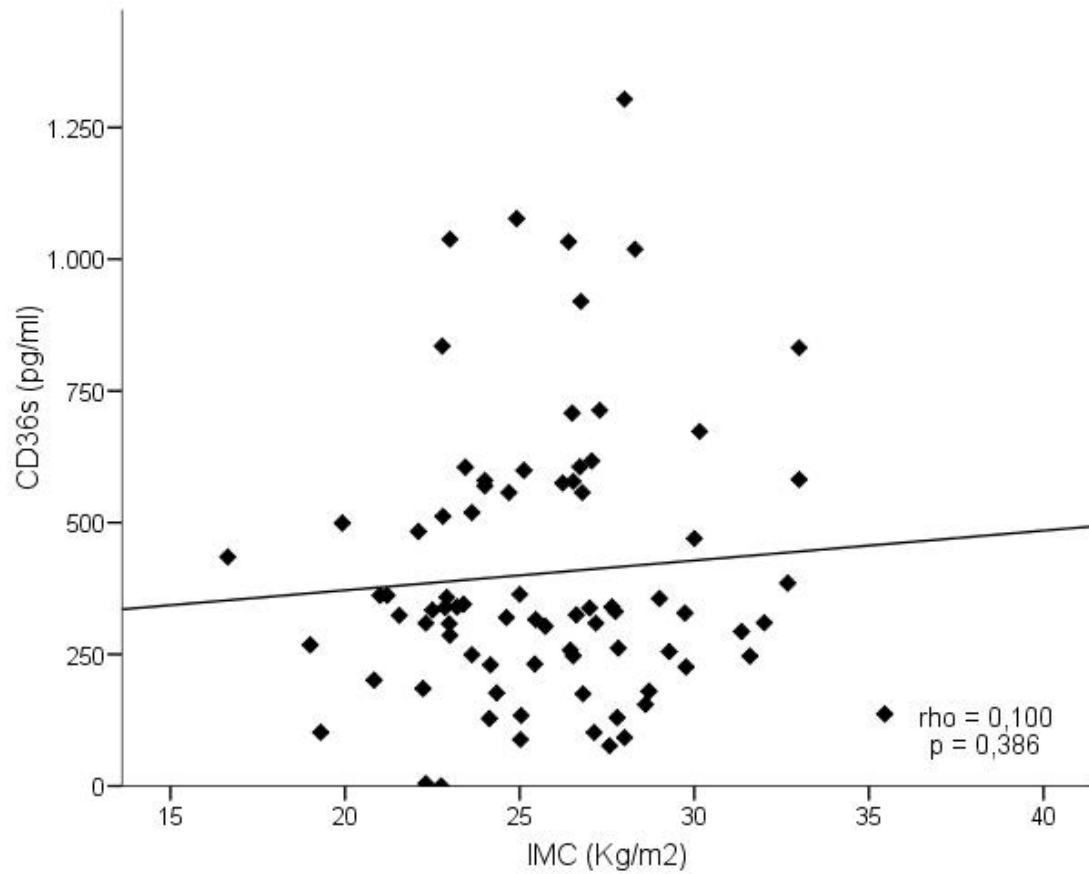


Figura 29. Las concentraciones séricas de CD36s no se correlacionan con el índice de masa corporal (IMC) en los pacientes con hepatitis crónica por VHC (n=87). CD36s: CD36 soluble. VHC: Virus de la hepatitis C.

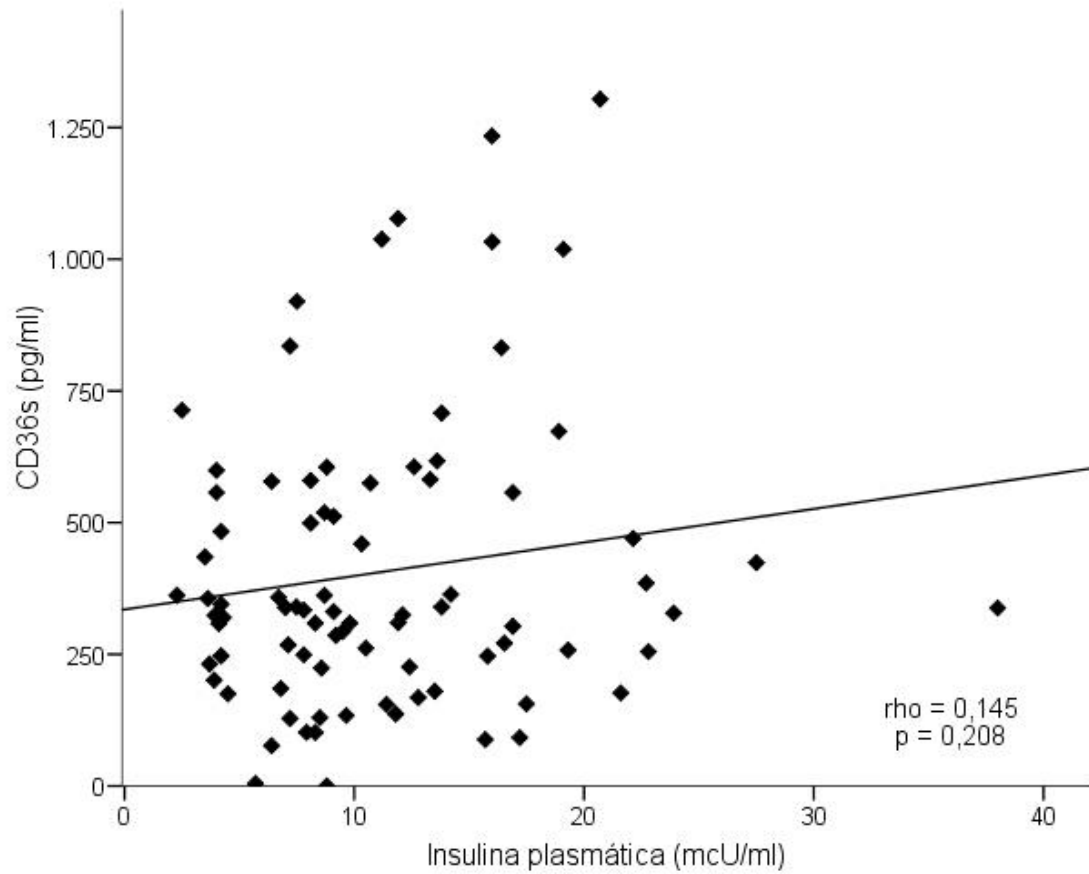


Figura 30. Las concentraciones séricas de CD36s no se correlacionan con la insulina plasmática en los pacientes con hepatitis crónica por VHC (n=87). CD36s: CD36 soluble. VHC: Virus de la hepatitis C.

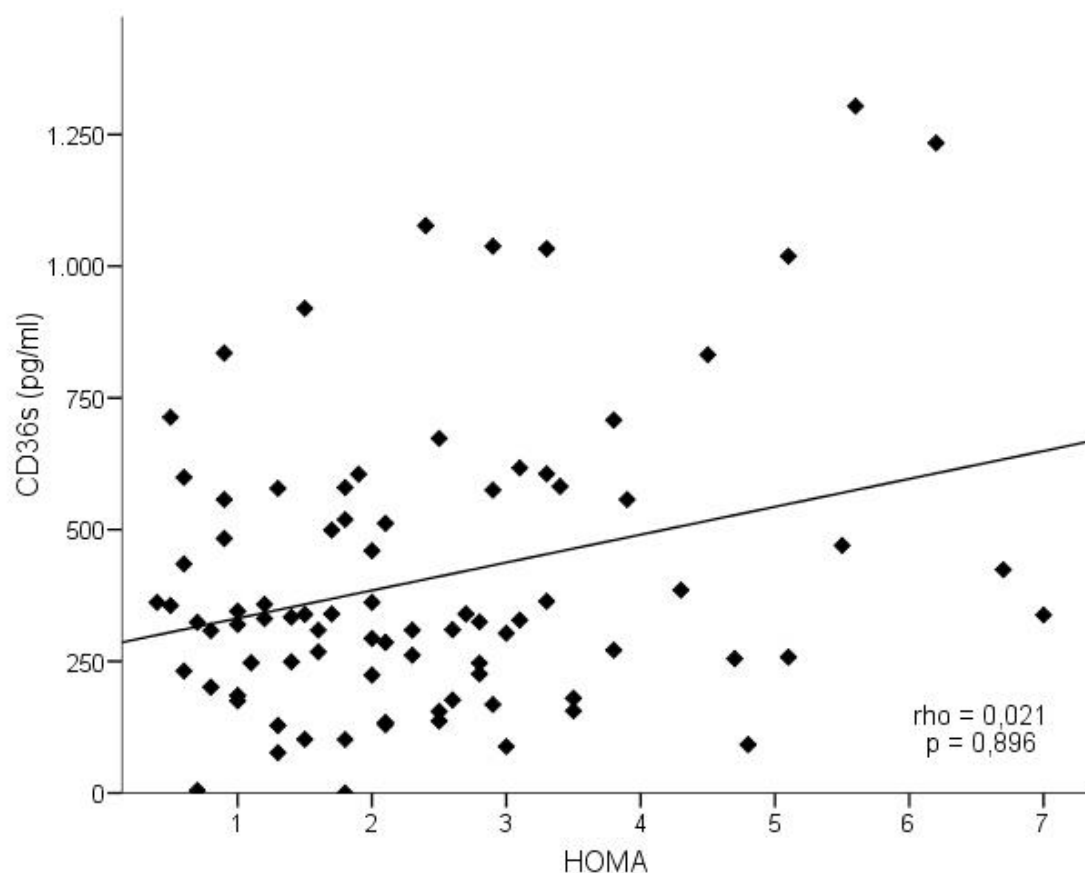


Figura 31. Las concentraciones séricas de CD36s no se correlacionan con el índice de resistencia a la insulina (HOMA) en los pacientes con hepatitis crónica por VHC (n=87). CD36s: CD36 soluble. VHC: Virus de la hepatitis C.

2.4. CORRELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE CD36 SOLUBLE Y EL ÍNDICE DE EXPRESIÓN HEPÁTICO DE CD36

A continuación se analizó si las concentraciones séricas de CD36s están relacionadas con el nivel de expresión de CD36 en el hígado de los pacientes incluidos en este estudio. Como se puede observar en la figura 32, se encontró una correlación positiva entre los valores séricos de CD36s y el índice de expresión hepático de CD36 en la cohorte global de pacientes estudiados ($\rho=0,499$, $p = 0,001$; Figura 32) .

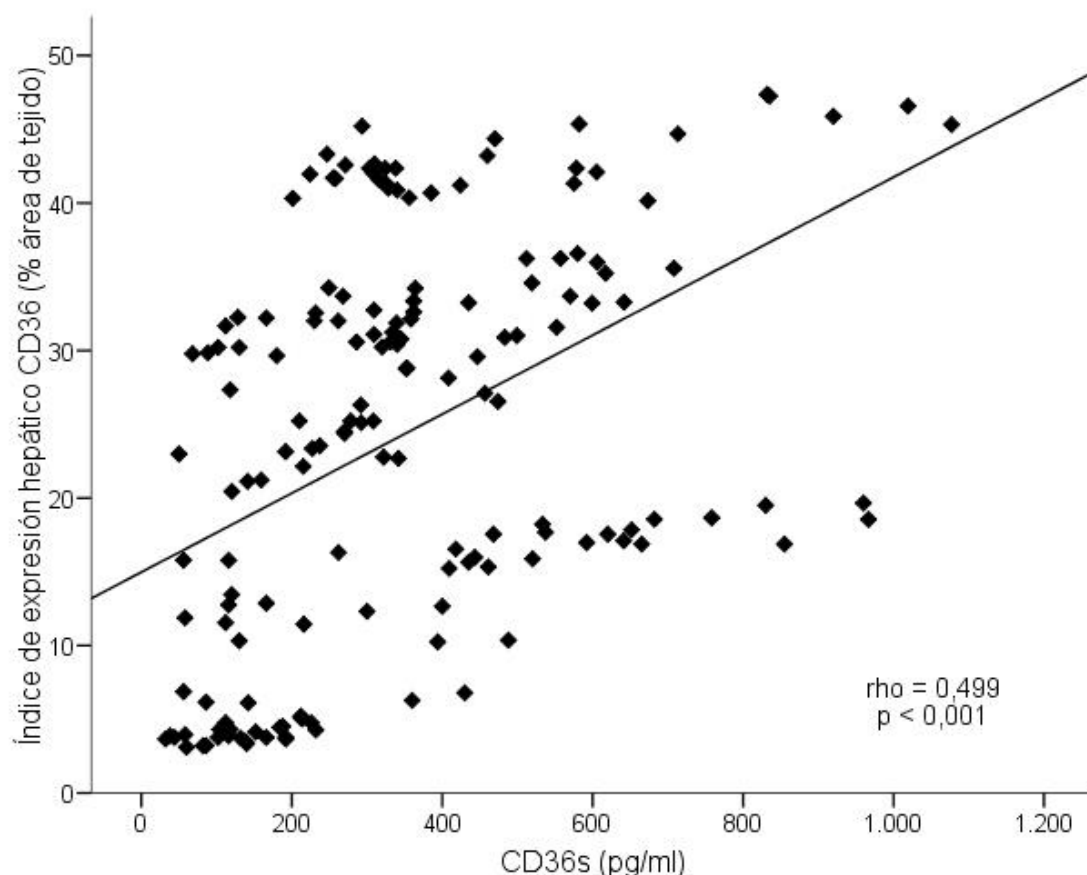


Figura 32. Correlación positiva entre la concentración sérica de CD36s y el índice de expresión hepático de CD36 en la cohorte de pacientes estudiados (HN=32. EHGNA=66. VHC=64). CD36s: CD36 soluble; HN: Hígado normal. EHGNA: Enfermedad hepática grasa no alcohólica. VHC: Virus de la hepatitis C.

2.5. LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE CD36 SOLUBLE SE ASOCIAN DE FORMA INDEPENDIENTE CON ESTEATOSIS AVANZADA EN PACIENTES CON EHGNA

Con el fin de evaluar la potencial asociación entre los valores séricos de CD36s y la presencia o ausencia de esteatosis avanzada (esteatosis grado ≥ 2) en pacientes con EHGNA, se analizaron diferentes modelos de regresión logística ajustados por variables confusas demográficas, antropométricas y metabólicas.

Tabla 7. Modelos de regresión logística que analizan la asociación entre la presencia de esteatosis avanzada (grado ≥ 2) en pacientes con EHGNA y las concentraciones séricas de CD36s y otras variables

| Variables | OR (95% IC) | Valor de p | AUROC (95% IC) |
|----------------|-----------------------|------------|--------------------|
| Modelo 1 | | | |
| CD36s | 1,002 (1,001 - 1,004) | < 0,001 | 0,65 (0,58 - 0,73) |
| Modelo 2 | | | |
| CD36s | 1,001 (1,000 - 1,002) | 0,021 | 0,78 (0,72 - 0,84) |
| Edad | 1,004 (0,980 - 1,030) | 0,699 | |
| Sexo | 2,371 (1,200 - 4,684) | 0,013 | |
| IMC | 1,084 (1,049 - 1,119) | < 0,001 | |
| Modelo 3 | | | |
| CD36s | 1,002 (1,000 - 1,003) | 0,001 | 0,74 (0,67 - 0,81) |
| HOMA | 1,520 (1,133 - 2,039) | 0,005 | |
| Colesterol-HDL | 0,970 (0,947 - 0,994) | 0,014 | |
| Triglicéridos | 1,002 (0,997 - 1,006) | 0,348 | |

CD36s: CD36 soluble. AUROC: Área bajo la curva ROC. OR: Odds ratio. IC: Intervalo de confianza. HOMA: Índice de resistencia a la insulina. HDL: lipoproteína de alta densidad. IMC: Índice de masa corporal.

Las concentraciones séricas de CD36s se asocian de forma independiente con la presencia de esteatosis avanzada en el modelo 1 (sin ajustar) y en el modelo 2 ajustado por edad, sexo e IMC [odds ratio (OR): 1,001; 95 % intervalo de confianza (IC) 1,000-1,002; $p = 0,021$].

Dado que es posible que la asociación entre CD36s y esteatosis avanzada sea simplemente porque los pacientes con EHGNA y mayor contenido de grasa hepática tengan más alteraciones metabólicas, se analizó un modelo de regresión logística adicional (modelo 3) ajustado por variables metabólicas. De esta forma se comprobó que las concentraciones séricas de CD36s se asocian significativamente con esteatosis avanzada (OR, 1,002; 95% IC, 1,000-1,003; $p = 0,001$; Tabla 7) en el modelo 3 después de ajustar por variables metabólicas (índice HOMA, Colesterol-HDL y triglicéridos) (Tabla 7).

Para evaluar el valor de las concentraciones séricas de CD36s y predecir la presencia de esteatosis avanzada en pacientes con EHGNA, se calcularon curvas ROC y sus respectivas áreas bajo la curva (AUROC) para cada uno de los distintos modelos de regresión logística anteriormente mencionados. El valor de AUROC para el modelo 1 fue de 0,65, para el modelo 2 de 0,78 y para el modelo 3 de 0,74 (Tabla 7).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral demuestran que los niveles hepáticos de ARNm así como el contenido proteico de CD36 están anormalmente aumentados en los pacientes con EHGNA y en aquellos con hepatitis crónica por VHC. Además, los hallazgos inmunohistoquímicos que se muestran en este trabajo indican de manera convincente que CD36 se expresa predominantemente en la membrana plasmática de los hepatocitos de pacientes con EHGNA así como también de pacientes con hepatitis crónica por VHC con esteatosis asociada. Uno de los resultados más interesantes de este trabajo de Tesis Doctoral es la correlación positiva que encontramos entre el índice de expresión hepático de CD36 y las concentraciones plasmáticas de insulina, el índice HOMA y el grado histológico de la esteatosis en los pacientes con EHGNA y en los pacientes con hepatitis crónica por VHC con esteatosis hepática concomitante.

El presente trabajo de Tesis Doctoral es el primer estudio que caracteriza el patrón de expresión de CD36, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en el hígado de pacientes con diferentes manifestaciones histológicas de la EHGNA, como la ESNA y la EHNA, así como en el hígado de pacientes con hepatitis crónica por VHC con y sin esteatosis asociada. Previamente, Greco y cols. (124) estudiaron 10 pacientes obesos con ESNA, 5 con esteatosis leve y 5 con esteatosis avanzada, y encontraron que los niveles hepáticos de ARNm de CD36 eran más elevados en los pacientes con esteatosis avanzada. Por otro lado, autores como Bechmann y cols.(125) observaron que los niveles de ARNm de CD36 estaban también aumentados en el hígado de pacientes con EHNA y que se correlacionaban positivamente con el grado de apoptosis hepatocitaria. Sobre la base de estos resultados, ambos grupos de investigación concluyeron que la sobreexpresión hepática de CD36 podría estar implicada en la patogenia de la esteatosis y del daño hepatocelular por apoptosis en la EHGNA y en la EHNA, respectivamente. No obstante, la interpretación de estos hallazgos es incierta por varias razones pero, fundamentalmente, porque se ha descrito la ausencia de correlación entre los niveles hepáticos de ARNm y de proteína de CD36 en modelos

animales de esteatosis hepática (136). Reforzando aún más este concepto, Buqué y cols. (119) demostraron que los niveles de ARNm de CD36 aumentaba en los hepatocitos de ratas obesas Zucker en paralelo con el grado histológico de esteatosis, mientras que la cantidad total de la proteína CD36 permanecía inalterada en los hepatocitos esteatósicos. Por el contrario, en el presente estudio se encontró que tanto el nivel de ARNm como el contenido proteico de CD36 aumentaba de manera similar en el hígado de los pacientes con EHGNA y también en el de los pacientes con hepatitis crónica por VHC, siendo máximo este aumento en los pacientes VHC con esteatosis concomitante. Los resultados de este estudio demuestran por primera vez que existe una relación directa entre los niveles hepáticos de ARNm y de proteína de CD36 tanto en pacientes con EHGNA como en pacientes con hepatitis crónica por VHC, con o sin esteatosis concomitante, sugiriendo que este transportador de AGL puede estar jugando un papel activo en la patogenia de la esteatosis hepática asociada o no a la infección crónica por el VHC. Un hecho que se debe destacar es que los niveles hepáticos más elevados de ARNm y de proteína de CD36 se encontraron en los pacientes con hepatitis crónica por VHC con esteatosis, lo cual podría explicarse en parte por la capacidad del VHC para inducir la transcripción de distintos genes celulares (137-139), pero aún se desconoce si el VHC es capaz de activar la transcripción del gen de CD36 en los hepatocitos.

Otro hallazgo novedoso de este trabajo de Tesis Doctoral es la descripción del patrón de distribución subcelular de CD36 en los hepatocitos de pacientes con EHGNA y con hepatitis crónica por VHC. Con respecto a los pacientes con EHGNA, CD36 se expresa fundamentalmente en la membrana plasmática de los hepatocitos, tanto en los casos de EHGNA como de EHNA, mientras que en el hígado normal la expresión de este transportador de AGL se restringe al citoplasma de algunos hepatocitos dispersos por el lobulillo hepático. En relación a los pacientes con hepatitis crónica por VHC, el perfil de expresión de CD36 en los hepatocitos depende de la presencia o no de esteatosis concomitante. Más concretamente, la expresión de CD36 se restringe al citoplasma de los hepatocitos en los casos sin esteatosis mientras que CD36 se expresa además en la membrana plasmática de los hepatocitos

en los casos con esteatosis asociada. Todos estos hallazgos sugieren que la localización de CD36 en la membrana plasmática de los hepatocitos podría tener alguna relación con la acumulación de grasa en las células hepáticas, tanto en la EHGNA como en la infección crónica por el VHC.

Es un hecho bien conocido que la función de CD36 como transportador de AGL al interior de la célula depende fundamentalmente de su distribución subcelular, estando funcionalmente inactiva cuando se localiza en depósitos citoplasmáticos y activándose cuando se transloca a la membrana plasmática (140). La primera evidencia convincente de que el aumento de la expresión de CD36 en la membrana plasmática se acompañaba de un incremento de la captación e internalización de AGL en la célula, se obtuvo tras unos experimentos realizados por Bonen y cols. (141) en el músculo esquelético de rata *in vivo*, sometido a estímulos eléctricos cortos que provocaban contracciones musculares y un aumento de la captación intracelular de AGL. Los autores comprobaron que CD36 se expresaba tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma de las células musculares en reposo y que al iniciarse la contracción muscular, se producía una marcada disminución de los depósitos intracelulares de CD36, al tiempo que un significativo aumento de la cantidad de CD36 en la membrana plasmática. Ya que en un periodo tan corto de tiempo (< 30 minutos) no se produce síntesis *de novo* de CD36, los autores concluyeron que el aumento de la captación de AGL tras una contracción muscular se debía a la translocación de CD36 desde el citoplasma a la membrana plasmática de las células musculares.

La translocación de CD36 a la membrana plasmática se ha descrito también en células musculares cardíacas y en otros tipos celulares como las plaquetas y los neumocitos (142). En este sentido, Luiken y cols.(143) demostraron de manera fehaciente que, en células musculares de corazón de rata, la contracción muscular producida por una corta electroestimulación provocaba un aumento de la incorporación de ácido palmítico en los cardiomiocitos específicamente dependiente de la expresión de CD36 en la membrana plasmática. Los autores observaron que un inhibidor selectivo del sitio de unión de CD36 a los AGL provocaba una marcada disminución de la incorporación de palmitato a la célula y además, comprobaron que CD36 se

translocaba a la membrana de una manera similar a la que ocurría en las células de músculo esquelético. Todos estos resultados experimentales han servido para reconocer que el transporte de AGL en las células musculares, tanto esqueléticas como cardíacas, está estrechamente regulado a nivel de la membrana plasmática y, en gran medida, por la translocación de CD36 desde el citoplasma a la membrana inducida por la contracción muscular. Debido a esta característica de CD36, a este transportador de AGL también se le conoce con el nombre de ácido graso translocasa.

Un hallazgo interesante fue que la insulina, la principal hormona reguladora del metabolismo energético de los mamíferos, es capaz de inducir también la translocación de CD36 a la membrana plasmática de los miocitos y cardiomiocitos. Luiken y cols. demostraron, en ambos tipos celulares, que la insulina inducía un aumento de la incorporación intracelular de palmitato en paralelo con una translocación de CD36 desde el citoplasma a la membrana plasmática (143, 144). Estos mismos autores demostraron que este efecto estaba mediado específicamente por la insulina ya que lo revertían con un inhibidor selectivo de la fosfatidilinositol-3-quinasa, un mediador clave de la señalización intracelular inducida por la insulina. Dado que toda esta evidencia experimental indica que la insulina incrementa la incorporación de AGL en las células musculares, induciendo la translocación a la membrana de CD36, es concebible que esta hormona pueda también influir en el transporte de AGL en otros tipos celulares claves para el metabolismo de los lípidos como son los hepatocitos. En este sentido, Buqué y cols. encontraron que los hepatocitos de las ratas obesas Zucker, las cuales se caracterizan por presentar resistencia a la insulina y esteatosis hepática (145), expresan una mayor cantidad de CD36 en la membrana plasmática que en el citoplasma (146). Un hecho interesante de este estudio fue que la localización de CD36 en la membrana sólo persistía cuando estos hepatocitos eran cultivados en presencia de dosis altas de insulina, sugiriendo que la hiperinsulinemia crónica, característica de estas ratas obesas Zucker, podría explicar la translocación de CD36 a la membrana hepatocelular y por consiguiente contribuir a la esteatosis hepática. Si la insulina también puede inducir la translocación de CD36 a la membrana plasmática de los hepatocitos humanos está aún por dilucidar, pero los

resultados que se presentan en este trabajo de Tesis Doctoral apoyan esta hipótesis, ya que demuestran que existe una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre el índice de expresión hepático de CD36 y las concentraciones plasmáticas de insulina, tanto en los pacientes con EHGNA como en aquellos con hepatitis crónica por VHC, en paralelo con la localización predominante de CD36 en la membrana plasmática de los hepatocitos de estos pacientes.

Hasta ahora, existen pocos datos publicados en la literatura científica acerca del posible papel de CD36 en la esteatosis hepática en humanos. La deficiencia genética de CD36 es relativamente frecuente (3-5%) en individuos de raza negra y en asiáticos (111). Estos individuos se caracterizan por la presencia de resistencia a la insulina y de concentraciones circulantes elevadas de AGL y de triglicéridos, así como, de concentraciones bajas de colesterol HDL (147). En estas personas se ha demostrado que la captación de un análogo del ácido palmítico en las células musculares del corazón está significativamente disminuida (148), pero se desconoce si la deficiencia genética de CD36 afecta al contenido hepático de triglicéridos. Por el contrario, la evidencia científica en roedores acerca de la relevancia patogénica de CD36 en la esteatosis hepática es mucho más sólida. La esteatosis hepática inducida por una dieta rica en grasas se acompaña de una sobreexpresión de CD36 en el hígado de los ratones esteatósicos (120). La demostración más fehaciente de que CD36 juega un papel crucial en el desarrollo de la esteatosis hepática la aportaron unos experimentos realizados por Zhou y cols. estudiando ratones genéticamente deficientes de CD36 (122). Estos autores comprobaron que la administración de agonistas de factores de transcripción pro-lipogénicos, como el receptor X del hígado (LXR), el receptor X pregnano (PXR) y el receptor activador de la proliferación de los peroxisomas gamma (PPAR- γ), producía esteatosis hepática e inducía la expresión de CD36 en los hepatocitos de los ratones normales pero no en los ratones sin el gen de CD36, indicando que esta ácido graso translocasa es crucial para que se produzca la esteatosis hepática en el ratón. De acuerdo con estos resultados, en este trabajo de Tesis Doctoral se encontró una correlación positiva entre el índice de expresión hepático de CD36 y el grado histológico de la esteatosis hepática en pacientes

con EHNA y en pacientes con hepatitis crónica por VHC. La localización predominante de esta ácido graso translocasa en la membrana plasmática de los hepatocitos de estos pacientes, refuerza la idea de que el aumento de la expresión y de la función de CD36 en los hepatocitos podría contribuir de manera determinante a la patogenia de la esteatosis hepática en los seres humanos, de una manera similar a la ya demostrada en roedores.

Existen evidencias experimentales que sugieren que una excesiva función de CD36 a nivel muscular, como ácido graso translocasa, probablemente contribuya a la resistencia periférica a la insulina mediante el aumento de la captación de AGL en las células musculares (111). En este sentido, se ha demostrado que CD36 se sobreexpresa en la membrana plasmática de las células musculares de pacientes con DM2, así como en modelos animales de diabetes, acompañándose de un incremento persistente de la captación muscular de AGL y de una alteración del metabolismo glucídico dependiente de la insulina (115). Además, se ha comprobado que la sensibilidad periférica a la insulina es mejor en ratones deficientes del gen de CD36, que se caracterizan por presentar una menor captación de AGL a nivel muscular (102). La implicación de CD36 en la resistencia periférica a la insulina se explicaría en gran medida porque el exceso intramuscular de TG y de sus intermediarios metabólicos, como el diacilglicerol y las ceramidas, que se produciría como consecuencia de la sobreexpresión de esta ácido graso translocasa en las células musculares, interfiere la señalización intracelular de la insulina mediante la activación de isoformas inhibitorias de la PKC y también inhibiendo la fosforilación de Akt (142). Por el contrario, se desconoce si CD36 podría jugar algún papel en la fisiopatología de la resistencia a la insulina a nivel hepático. Recientemente, se ha descrito que la señalización intracelular de la insulina, fundamentalmente la fosforilación de Akt y de FoxO1, está marcadamente inhibida en el hígado de pacientes con EHNA y en pacientes con infección crónica por el VHC (149). La interpretación de este hallazgo conjuntamente con los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral, fundamentalmente la correlación positiva entre el índice de expresión hepático de CD36 y el índice HOMA de resistencia a la insulina en una población similar de pacientes con EHNA y con infección crónica por el VHC, sugiere que el

incremento de la expresión y función de CD36 en los hepatocitos podría contribuir a la resistencia hepática a la insulina en estas enfermedades crónicas del hígado. Es imprescindible, no obstante, la realización de experimentos, tanto in vitro como in vivo, con el fin de demostrar de manera fehaciente si la expresión y función de CD36, como transportador de AGL al interior de la célula, es capaz de interferir la señalización de la insulina en el hepatocito.

Handberg y cols. han descrito recientemente una forma soluble de CD36 (CD36s), con un peso molecular similar al de la forma unida a membrana, que se puede detectar en el plasma humano y de la que encontraron concentraciones circulantes elevadas en pacientes obesos, con o sin diabetes asociada, proponiendo estos autores que CD36s podría ser útil como marcador de síndrome metabólico y arteriosclerosis (126). Estos mismos autores han comprobado que las concentraciones plasmáticas de CD36s se correlacionan positivamente con el grado de resistencia a la insulina y de arteriosclerosis en distintas poblaciones de pacientes y en la población general (127, 128). Un aspecto interesante es que las concentraciones plasmáticas de CD36s están aumentadas en patologías asociadas a un incremento del nivel de expresión de CD36 a nivel celular y tisular, por lo que se ha propuesto que las concentraciones circulantes de CD36s podrían ser un reflejo de la sobreexpresión de CD36 en tejidos y/o células implicadas en la fisiopatología del síndrome metabólico, como los adipocitos, miocitos y macrófagos tisulares (123, 150, 151). Teniendo en cuenta esta hipótesis, es probable que las concentraciones circulantes de CD36s estén elevadas en pacientes con EHGNA y también en pacientes con hepatitis crónica por VHC, ya que la expresión de CD36 está marcadamente aumentada en los hepatocitos de estos pacientes como se ha demostrado en este trabajo de Tesis Doctoral. Apoyando esta presunción, Handberg y cols. (130) han encontrado que las concentraciones plasmáticas de CD36s están elevadas en individuos no diabéticos con signos ecográficos de hígado graso, pero se desconoce si las concentraciones circulantes de CD36s se correlacionan con la cantidad de grasa intrahepática así como con el patrón de expresión de CD36 en el hígado.

Partiendo de esta premisa como hipótesis de trabajo, uno de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral fue determinar las concentraciones

de CD36s en el suero de una cohorte de pacientes con EHGNA diagnosticada por biopsia hepática en comparación con un grupo de pacientes con colelitiasis e hígado histológicamente normal. Los resultados obtenidos demuestran que las concentraciones séricas de CD36s fueron significativamente más altas en los pacientes con ESNA que en los pacientes con hígado normal, mientras que no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones circulantes de CD36s entre el grupo de pacientes con EHNA y el grupo con hígado normal (Tabla 5 y Figura 23). Un dato interesante fue que las concentraciones de CD36s aumentaban paralelamente con el grado histológico de esteatosis, detectándose las concentraciones circulantes más altas de CD36s en los pacientes con esteatosis avanzada (grados 2 y 3) (Figura 24). Esta observación explica en gran medida el hecho de que las concentraciones séricas de CD36s fueran más altas en el grupo de pacientes con ESNA que en aquellos con EHNA, ya que la proporción de pacientes con esteatosis avanzada fue mayor en la cohorte de pacientes con ESNA (Tabla 5).

Como se ha mencionado anteriormente, se ha descrito que las concentraciones circulantes de CD36s se correlacionan positivamente con el grado de resistencia a la insulina en poblaciones de pacientes obesos y diabéticos (126, 127), lo que ha supuesto que algunos autores consideren que CD36s puede ser un marcador de resistencia a la insulina y síndrome metabólico (129). En línea con esta hipótesis, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral muestran que las concentraciones circulantes de CD36s se correlacionan positivamente con el índice de masa corporal, las concentraciones plasmáticas de insulina y el índice HOMA de resistencia a la insulina (Figuras 26, 27 y 28, respectivamente) en los pacientes con EHGNA, reforzando aún más el papel central de la resistencia a la insulina en la patogenia de esta enfermedad hepática (152). Otro aspecto relevante que merece la pena destacar es la potencial relación entre CD36s y el riesgo vascular, ya que se ha observado que las concentraciones plasmáticas de CD36s son significativamente más altas en los pacientes con arteriosclerosis carotídea sintomática que en los asintomáticos (128). Asimismo, Chmielewski y cols. (153) observaron que los valores circulantes elevados de CD36s se asociaban con una mayor mortalidad por causas cardiovasculares en pacientes

con insuficiencia renal crónica avanzada. Dado que la EHGNA se asocia con una mayor morbi-mortalidad cardiovascular (154, 155), es posible que la determinación de CD36s pueda ser de utilidad para evaluar el riesgo cardiovascular en esta población de pacientes. En este trabajo de Tesis Doctoral no se ha analizado la prevalencia de enfermedad vascular carotídea o cardíaca en la población de pacientes con EHGNA, por lo que sería necesario la realización de estudios clínicos adicionales, de corte transversal y/o longitudinal, con el objetivo de dilucidar si CD36s puede ser de utilidad como marcador de enfermedad vascular o, lo que sería aún más interesante, como predictor de morbi-mortalidad cardiovascular en los pacientes con EHGNA.

El impacto de la EHGNA a nivel de salud pública es muy relevante ya que actualmente se considera la enfermedad hepática crónica más frecuente en el mundo desarrollado (8). Las cifras sobre su prevalencia, no obstante, varían entre el 3 y el 50% dependiendo del tipo de población pero, sobre todo, del método utilizado para la detección de la EHGNA en la población de estudio, como las enzimas hepáticas, la ecografía o la resonancia magnética (156, 157). Tanto los procedimientos bioquímicos como las pruebas de imagen mencionadas son menos sensibles y específicas para el diagnóstico de la EHGNA que la biopsia hepática, que es el método de elección para establecer el diagnóstico de esta enfermedad hepática y para diferenciar con fiabilidad la ESNA de la EHNA, así como también para valorar el estadio de fibrosis (158). Dado que la biopsia hepática es una técnica costosa e invasiva, no exenta de complicaciones potencialmente graves, el descubrimiento de métodos fiables para la detección no invasiva de la EHGNA se ha convertido en una de las áreas más activas de la investigación clínica en el campo de la hepatología. En este sentido, uno de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral fue evaluar la utilidad de la determinación de las concentraciones séricas de CD36s para el diagnóstico no invasivo de la EHGNA. Los resultados obtenidos tras el análisis de distintos modelos de regresión logística multivariante, ajustados por variables demográficas, antropométricas y metabólicas, muestran que los valores séricos de CD36s se asocian significativamente con la presencia de esteatosis avanzada en los pacientes con EHGNA. No obstante, la eficacia de CD36s para el diagnóstico de esteatosis avanzada en la población de estudio

fue discreta, con un valor del área bajo la curva ROC de 0,74 (Tabla 7). Estos datos, aunque prometedores, no son suficientemente concluyentes para considerar los valores séricos de CD36s como un marcador aceptable para el diagnóstico no invasivo de ESNA, por lo que es necesaria la realización de estudios clínicos adicionales que incluyan un gran número de pacientes con EHGNA con el fin de dilucidar la utilidad de la determinación de las concentraciones séricas de CD36s en la evaluación clínica de los pacientes con EHGNA.

En este trabajo de Tesis Doctoral se describe por primera vez la existencia de una significativa correlación entre las concentraciones circulantes de CD36s y el índice de expresión hepático de CD36 ($\rho = 0,499$, Figura 32), sugiriendo que el aumento de los valores de CD36s en el suero de los pacientes con EHGNA y con hepatitis crónica por VHC se debe en gran medida a la sobreexpresión de CD36 que se observa en la membrana plasmática de los hepatocitos de estos pacientes. La interpretación de estos resultados apoya la hipótesis de que el nivel de expresión de CD36 en el hígado podría contribuir de manera relevante al pool circulante de CD36s. Se desconocen, no obstante, la estructura y los mecanismos implicados en la generación de la fracción soluble de CD36. Un mecanismo potencial podría ser que CD36s se originase como consecuencia de la degradación proteolítica de la proteína CD36 unida a membrana, pero esto es poco probable ya que la estructura de CD36 le confiere una elevada resistencia a proteasas (159). Más recientemente, se ha descrito que en individuos sanos CD36s circula en el plasma dentro de una subpoblación de micropartículas de origen plaquetario (160). Se desconoce, en cualquier caso, si la estructura y el origen del CD36s circulante que se detecta en el suero de los pacientes con EHGNA y con hepatitis crónica por VHC es similar al descrito en individuos sanos.

Aunque Petta y cols. observaron que las concentraciones circulantes de CD36s se asociaban significativamente con el grado histológico de esteatosis en pacientes con hepatitis crónica por VHC (131), los resultados de esta Tesis Doctoral muestran una ausencia de correlación entre los valores séricos de CD36s y el grado histológico de la esteatosis hepática asociada a la hepatitis crónica por VHC (Figura 25). Estos resultados contradictorios se pueden

explicar fundamentalmente por las diferencias significativas entre ambos estudios, en relación a las características de los pacientes con hepatitis crónica por VHC evaluados, así como en el método utilizado para la detección de CD36s en plasma y en suero, respectivamente. Por todo ello, con el fin de establecer el verdadero significado de los valores circulantes de CD36s en los pacientes con infección crónica por el VHC, es preciso realizar más estudios con un mayor número de pacientes bien caracterizados, desde un punto de vista virológico e histológico, y utilizando un método estandarizado para cuantificar las concentraciones plasmáticas o séricas de CD36s.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren que la inducción de la expresión y translocación de CD36 a la membrana plasmática de los hepatocitos puede ser determinante en la fisiopatología de la esteatosis hepática, tanto en la EHGNA como en la infección crónica por el VHC. Por consiguiente, la modulación de la expresión y/o translocación a la membrana plasmática de los hepatocitos de esta ácido graso translocasa podría ser de utilidad para la prevención y/o tratamiento de la esteatosis hepática, evitando o disminuyendo las consecuencias deletéreas de la excesiva acumulación de grasa en los hepatocitos sobre la evolución clínica de la EHGNA y de la hepatitis crónica por VHC. Por todo ello, la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión y translocación a la membrana plasmática de los hepatocitos de CD36 sería de gran importancia, ya que permitiría identificar nuevas dianas moleculares con un potencial valor terapéutico para los pacientes con EHGNA y con hepatitis crónica por VHC.

Por otro lado, en este trabajo de Tesis Doctoral se ha demostrado que las concentraciones séricas de la fracción soluble de CD36, denominada CD36s, se encuentran anormalmente elevadas en los pacientes con EHGNA y en los pacientes con infección crónica por el VHC. Aunque los resultados obtenidos en este estudio indican que la determinación de los valores circulantes de CD36s se correlacionan significativamente con la cantidad de grasa en el hígado de los pacientes con EHGNA y, por tanto, sugieren su potencial utilidad como marcador de esteatosis avanzada en esta población de pacientes, es imprescindible que estos resultados sean reproducidos y

validados en posteriores estudios clínicos independientes, con el fin de establecer la verdadera utilidad de CD36s para el diagnóstico no invasivo y el seguimiento clínico de los pacientes con EHGNA, una enfermedad hepática crónica que, por su elevada prevalencia en nuestro medio y su potencial progresión a cirrosis y hepatocarcinoma, constituye en la actualidad un problema de primer orden para los sistemas nacionales de salud de los países desarrollados.

CONCLUSIONES

- 1) La expresión génica de CD36 se incrementa de manera anormal en el hígado de los pacientes con EHGNA y en el de los pacientes con hepatitis crónica por VHC.
- 2) La cantidad de la proteína CD36 es significativamente mayor en el hígado de los pacientes con EHGNA y en el de los pacientes con hepatitis crónica por VHC que en el hígado normal.
- 3) La ácido graso translocasa CD36 se expresa predominantemente en la membrana plasmática de los hepatocitos en los pacientes con EHGNA y en los pacientes con hepatitis crónica por VHC con esteatosis asociada.
- 4) El índice de expresión hepático de CD36 se correlaciona con el índice HOMA de resistencia a la insulina y con el grado histológico de esteatosis en los pacientes con EHGNA y en los pacientes con hepatitis crónica por VHC.
- 5) Las concentraciones séricas de CD36s se correlacionan positivamente con el índice de masa corporal, con el índice HOMA de resistencia a la insulina y con el grado histológico de esteatosis en los pacientes con EHGNA, pero no en los pacientes con hepatitis crónica por VHC.
- 6) Los valores séricos de CD36s se asocian de manera independiente con la presencia de esteatosis avanzada en los pacientes con EHGNA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980;55(7):434-8.
2. Peters RL, Gay T, Reynolds TB. Post-jejuno-ileal-bypass hepatic disease. Its similarity to alcoholic liver disease. *Am J Clin Pathol.* 1975;63:318-31.
3. Miller DJ, Ishimaru H, Klatskin G. Non-alcoholic liver disease mimicking alcoholic hepatitis and cirrhosis. *Gastroenterology.* 1979;77:27-9.
4. Adler M, Schaffner F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am J Med.* 1979;67:811-6.
5. French SW, Eidus LB, Freeman J. Nonalcoholic fatty hepatitis. An important clinical condition. *Can J Gastroenterol.* 1989;3:189-97.
6. Nagore N, Scheuer PJ. The pathology of diabetic hepatitis. *J Pathol.* 1988;156:155-60.
7. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16(42):5286-96.
8. Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem. *Clin Med.* 2011;11(2):176-8.
9. de Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol.* 2008;48(Suppl 1):S104-12.
10. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Castiglione A, Croce L, Tiribelli C, et al. Incidence and natural course of fatty liver in the general population: The Dionysos Study. *Hepatology.* 2007;46(5):1387-91.
11. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology.* 2003;37(5):1202-19.
12. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic and clinical implications. *Hepatology.* 2010;51(2):679-89.
13. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40(6):1387-95.

14. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008;40(12):1461-5.
15. Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang XM, et al. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2010;362(12):1082-9.
16. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006;43(2 Suppl 1):S99-112.
17. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology.* 2011;140(1):124-31.
18. Masuoka HC, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1281:106-22.
19. Denzer C, Thiere D, Muche R, Koenig W, Mayer H, Kratzer W, et al. Gender-specific prevalences of fatty liver in obese children and adolescents: Roles of body fat distribution, sex steroids, and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(10):3872-81.
20. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology.* 1994;107(4):1103-9.
21. García-Monzón C, Vargas-Castrillón J, Porrero JL, Alonso MT, Bonachía O, Castillo MJ, et al. High prevalence and risk factors for nonalcoholic steatosis and steatohepatitis among Spanish adults: A prospective study. *Hepatology.* 2014;manuscript under review.
22. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology.* 1990;12(5):1106-10.
23. Wasserman JM, Thung SN, Berman R, Bodenheimer HCJ, Sigal SH. Hepatic Weber-Christian disease. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):115-8.
24. Sanyal AJ, Campwell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: asociation of insulin

- resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001;120(5):1183-92.
25. Baranova A, Tran TP, Bирerdinc A, Younossi ZM. Systematic review: association of polycystic ovary syndrome with metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33(7):801-14.
 26. Musso G, Cassader M, Olivetti C, Rosina F, Carbone G, Gambino R. Association of obstructive sleep apnoea with the presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease. A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2013;14(5):417-31.
 27. Leise MD, Poterucha JJ, Talwalkar JA. Drug-induced liver injury. *Mayo Clin Proc*. 2014;89(1):95-106.
 28. Lann D, LeRoith D. Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Med Clin North Am*. 2007;91(6):1063-77.
 29. Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(1):G1-4.
 30. Haque M, Sanyal AJ. The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002;16(5):709-31.
 31. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004;114:147-52.
 32. Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(1):217S-22S.
 33. Greenfield JR, Campbell LV. Insulin resistance and obesity. *Clin Dermatol*. 2004;22(4):289-95.
 34. Weiss R. Fat distribution and storage: how much, where, and how? *Eur J Endocrinol*. 2007;157(Supl 1):S39-45.
 35. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001;50(8):1844-50.

36. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37(4):917-23.
37. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002;23(2):201-29.
38. de Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr*. 2002;21(3):219-23.
39. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-51.
40. Roden M. Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes--pathogenesis and clinical relevance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006;2(6):335-48.
41. Shuldiner AR, Hoppman N, Pollin TI. Hepatic lipase genotype, diabetes risk, and implications for preventative medicine. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2015-8.
42. Mannaerts GP, Van Veldhoven PP, Casteels M. Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys*. 2000;32:73-87.
43. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptative metabolic system. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:193-230.
44. Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5(2):233-44.
45. Romero-Gómez M. Hepatitis C and insulin resistance: steatosis, fibrosis and non-response. *Rev Esp Enf Dig*. 2006;98(8):605-15.
46. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: A case-control study. *Diabetes Care*. 2006;29(5):1096-101.

47. Bose SK, Ray R. Hepatitis C virus infection and insulin resistance. *W J Diabetes*. 2014;5(1):52-8.
48. Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, et al. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008;134(2):416-23.
49. Ortiz V, Berenguer M, Rayón JM, Carrasco D, Berenguer J. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(9):2408-14.
50. Everhart JE, Lok AS, Kim HY, Morgan TR, Lindsay KL, Chung RT, et al. Weight-related effects on disease progression in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Gastroenterology*. 2009;137(2):549-57.
51. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;146(3):726-35.
52. Sinha RA, Farah BL, Singh BK, Siddique MM, Li Y, Wu Y, et al. Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice. *Hepatology*. 2014;59(4):1366-80.
53. González-Rodríguez A, Mayoral R, Agra N, Valdecantos MP, Pardo V, Miquilena-Colina ME, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis*. 2014;5(e1179).
54. Lin CW, Zhang H, Li M, Xiong X, Chen X, Chen X, et al. Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice. *J Hepatol*. 2013;58(5):993-9.
55. Begriche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013;58(4):1497-507.
56. Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2013;48(4):434-41.
57. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and

- women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134(2):424-31.
58. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest*. 2008;118(1):316-32.
59. Mangia A, Ripoli M. Insulin resistance, steatosis and hepatitis C virus. *Hepatol Int*. 2013;7(Suppl 2):782-9.
60. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114:842-5.
61. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010;52(2):774-88.
62. Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Chung KW, Lee JH, et al. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *J Lipid Res*. 2008;49(1):84-97.
63. Diehl AM. Lessons from animal models of NASH. *Hepatol Res*. 2005;33(2):138-44.
64. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin. *Hepatology*. 2004;40(1):46-54.
65. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(1):59-69.
66. Pagliassotti MJ. Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Nutr*. 2012;32:17-33.
67. Abu-Shanab A, Quigley EM. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(12):691-701.
68. Tilg H, Moschen AR, Kaser A. Obesity and the microbiota. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1476-83.
69. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2013;57(2):601-9.

70. Adams L, Lymp J, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population based cohort study. *Gastroenterology*. 2005;129(1):113-21.
71. Day CP. Natural history of NAFLD: Remarkably benign in the absence of cirrhosis. *Gastroenterology*. 2005;129(1):375-8.
72. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006;44(4):865-73.
73. Söderberg C, Stål P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J, et al. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology*. 2010;51(2):595-602.
74. Vuppalanchi R, Chalasani N. Non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*. 2009;49(1):306-17.
75. Hernaez R, Yeung E, Clark JM, Kowdley KV, Brancati FL, Kao WH. Hemochromatosis gene and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2011;55(5):1079-85.
76. Mathiesen UL, Franzén LE, Aselius H, Resjö M, Jacobsson L, Foberg U, et al. Increased liver echogenicity at ultrasound examination reflects degree of steatosis but not of fibrosis in asymptomatic patients with mild/moderate abnormalities of liver transaminases. *Dig Liver Dis*. 2002;34(7):516-22.
77. Wang JH, Hung CH, Kuo FY, Eng HL, Chen CH, Lee CM, et al. Ultrasonographic quantification of hepatic-renal echogenicity difference in hepatic steatosis diagnosis. *Dig Dis Sci*. 2013;58(10):2993-3000.
78. Nouredin M, Lam J, Peterson MR, Middleton M, Hamilton G, Le T, et al. Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials (pages 1930–1940). *Hepatology*. 2013;58(6):1930-40.
79. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(9):2467-74.

80. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
81. Grandison GA, Angulo P. Can NASH be diagnosed, graded, and staged noninvasively? *Clin Liver Dis*. 2012;16(3):567-85.
82. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45(4):846-54.
83. Lichtinghagen R, Pietsch D, Bantel H, Manns MP, Brand K, Bahr MJ. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *J Hepatol*. 2013;59(2):236-42.
84. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology*. 2004;127(6):1704-13.
85. Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, Gogia SM, Neuschwander-Tetri BA. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut*. 2008;57(10):1441-7.
86. Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:6.
87. Sumida Y, Nakajima A, Itoh Y. Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(2):475-85.
88. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(3):603-8.
89. Wadden TA, Berkowitz RI, Womble LG, Sarwer DB, Phelan S, Cato RK, et al. Randomized trial of lifestyle modification and pharmacotherapy for obesity. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2111-20.

90. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;52(1):79-104.
91. Li Z, Maglione M, Tu W, Mojica W, Arterburn D, Shugarman LR, et al. Meta-analysis: pharmacologic treatment of obesity. *Ann Intern Med*. 2005;142(7):532-46.
92. Barker KB, Palekar NA, Bowers SP, Goldberg JE, Pulcini JP, Harrison SA. Non-alcoholic steatohepatitis: effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(2):368-73.
93. Omer Z, Cetinkalp S, Akyildiz M, Yilmaz F, Batur Y, Yilmaz C, et al. Efficacy of insulin-sensitizing agents in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22(1):18-22.
94. Rakoski MO, Singal AG, Rogers AM, Conjeevaram H. Meta-analysis: insulin sensitizers for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32(10):1211-21.
95. Miller ER III, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med*. 2005;142(1):37-46.
96. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, vitamin E or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010;362(18):1675-85.
97. Rallidis LS, Drakoulis CK, Parasi AS. Pravastatin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Atherosclerosis*. 2004;174(1):193-6.
98. Gómez-Domínguez E, Gisbert JP, Moreno-Monteagudo JA, García-Buey L, Moreno-Otero R. A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipidemic, non-alcoholic fatty liver patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(11):1643-7.
99. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Statins in non-alcoholic fatty liver disease and chronically elevated liver enzymes: a histopathological follow-up study. *J Hepatol*. 2007;47(1):135-41.
100. Du J, Ma YY, Yu CH, Li YM. Effects of pentoxifylline on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(2):569-77.

101. Machado MV, Cortez-Pinto H. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2012;11(4):440-9.
102. Hajri T, Abumrad NA. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:383-415.
103. Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev.* 2010;90(1):367-417.
104. Lobo S, Wiczer BM, Smith AJ, Hall AM, Bernlohr DA. Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. *J Lipid Res.* 2007;48(3):609-20.
105. Isola LM, Zhou SL, Kiang CL, Stump DD, Bradbury MW, Berk PD. 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(21):9866-70.
106. Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaine H, Amri EZ, Grimaldi P, Abumrad NA. Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(7):2646-51.
107. Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell.* 1994;79(3):427-36.
108. DiRusso CC, Li H, Darwis D, Watkins PA, Berger J, Black PN. Comparative biochemical studies of the murine fatty acid transport proteins (FATP) expressed in yeast. *J Biol Chem.* 2005;280(17):16829-37.
109. Stremmel W, Strohmeyer G, Berk PD. Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(11):3584-8.
110. Clarke DC, Miskovic D, Han XX, Calles-Escandon J, Glatz JF, Luiken JJ, et al. Overexpression of membrane associated fatty acid binding protein (FABPpm) in vivo increases fatty acid sarcolemmal transport and metabolism. *Physiol Genomics.* 2004;17(1):31-7.
111. Su X, Abumrad NA. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20:72-7.

112. Bonen A, Chabowski A, Luiken JJ, Glatz JF. Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:15-29.
113. Brinkmann JF, Abumrad NA, Ibrahimi A, van der Vusse GJ, Glatz JF. New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36. *Biochem J*. 2002;367:561-70.
114. Chabowski A, Górski J, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007;77(5-6):345-53.
115. Schwenk RW, Luiken JJ, Bonen A, Glatz JF. Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovasc Res*. 2008;79(2):249-58.
116. Bastie CC, Nahlé Z, McLoughlin T, Esser K, Zhang W, Unterman T, et al. FoxO1 stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*. 2005;280(14):1422-14229.
117. Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, et al. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336(1):215-22.
118. Degrace P, Moindrot B, Mohamed I, Gresti J, Du ZY, Chardigny JM, et al. Upregulation of liver VLDL receptor and FAT/CD36 expression in LDLR^{-/-} apoB100/100 mice fed trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid. *J Lipid Res*. 2006;47(12):2647-55.
119. Buqué X, Martínez MJ, Cano A, Miquilena-Colina ME, García-Monzón C, Aspichueta P, et al. A subset of dysregulated metabolic and survival genes is associated with severity of hepatic steatosis in obese Zucker rats. *J Lipid Res*. 2010;51(3):500-13.
120. Liu LF, Purushotham A, Wendel AA, Belury MA. Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(6):G1671-82.

121. López-Parra M, Titos E, R. H, Ferré N, González-Pérez A, Martínez-Clemente M, et al. Regulatory effects of arachidonate 5-lipoxygenase on hepatic microsomal TG transfer protein activity and VLDL-triglyceride and apoB secretion in obese mice. *J Lipid Res.* 2008;49(12):2513-23.
122. Zhou J, Febbraio M, Wada TI, Zhai Y, Kuruba R, He J, et al. Hepatic fatty acid transporter CD36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology.* 2008;134(2):556-67.
123. Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H, et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes.* 2007;56:2863-71.
124. Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, et al. Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294(5):G1281-7.
125. Bechmann LP, Gieseler RK, Sowa JP, Kahraman A, Erhard J, Wedemeyer I, et al. Apoptosis is associated with CD36/fatty acid translocase upregulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2010;30(6):850-9.
126. Handberg A, Levin K, Højlund K, Beck-Nielsen H. Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: A novel marker of insulin resistance. *Circulation.* 2006;114(11):1169-76.
127. Handberg A, Norberg M, Stenlund H, Hallmans G, Attermann J, Eriksson JW. Soluble CD36 (sCD36) clusters with markers of insulin resistance, and high sCD36 is associated with increased type 2 diabetes risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1939-46.
128. Handberg A, Skjelland M, Michelsen AE, Sagen EL, Krohg-Sorensen K, Russell D, et al. Soluble CD36 in plasma is increased in patients with symptomatic atherosclerotic carotid plaques and is related to plaque instability. *Stroke.* 2008;39(11):3092-5.
129. Koonen DP, Jensen MK, Handberg A. Soluble CD36-a marker of the (pathophysiological) role of CD36 in the metabolic syndrome? *Arch Physiol Biochem.* 2011;117(2):57-63.
130. Handberg A, Højlund K, Gastaldelli A, Flyvbjerg A, Dekker JM, Petrie J, et al. Plasma sCD36 is associated with markers of atherosclerosis, insulin

- resistance and fatty liver in a nondiabetic healthy population. *J Int Med.* 2012;271(3):294-304.
131. Petta S, Handberg A, Marchesini G, Cammà C, Di Marco V, Cabibi D, et al. High sCD36 plasma level is associated with steatosis and its severity in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2013;20(3):174-82.
132. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.
133. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1996;24(2):289-93.
134. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
135. Yabe U, Sato C, Matsuda T, Kitajima K. Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J Biol Chem.* 2003;278:13875-80.
136. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2001;108(6):785-91.
137. García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, González-Pérez P, Gómez-Gonzalo M, Majano PL, López-Cabrera M, et al. Differential contribution of hepatitis C virus NS5A and core proteins to the induction of oxidative and nitrosative stress in human hepatocyte-derived cells. *J Hepatol.* 2005;43(4):606-13.
138. Núñez O, Fernández-Martínez A, Majano PL, Apolinario A, Gómez-Gonzalo M, Benedicto I, et al. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut.* 2004;53(11):1665-72.
139. Apolinario A, Majano PL, Lorente R, Núñez O, Clemente G, García-Monzón C. Gene expression profile of T-cell-specific chemokines in

- human hepatocyte-derived cells: evidence for a synergistic inducer effect of cytokines and hepatitis C virus proteins. *J Viral Hepat.* 2005;12(1):27-37.
140. Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36- mediated pathways. *J Lipid Res* 2009;2009(50):S86-S90.
141. Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, Glatz JF, Tandon NN. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem.* 2000;275(19):14501-8.
142. Koonen DPY, Glatz JFC, Bonen A, Luiken JJFP. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1736(3):163-80.
143. Luiken JJ, Arumugam Y, Bell RC, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, et al. Changes in fatty acid transport and transporters are related to the severity of insulin deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283(3):E612-21.
144. Luiken JJ, Koonen DP, Willems J, Zorzano A, Becker C, Fischer Y, et al. Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes.* 2002;51(10):3113-9.
145. Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):89-104.
146. Buqué X, Cano A, Miquilena-Colina ME, García-Monzón C, Ochoa B, P. A. High insulin levels are required for FAT/CD36 plasma membrane translocation and enhanced fatty acid uptake in obese Zucker rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303(4):E504-14.
147. Yamashita S, Hirano K, Kuwasako T, Janabi M, Toyama Y, Ishigami M, et al. Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients. *Mol Cell Biochem.* 2007;299(1-2):19-22.
148. Tanaka T, Nakata T, Oka T, Ogawa T, Okamoto F, Kusaka Y, et al. Defect in human myocardial long-chain fatty acid uptake is caused by FAT/CD36 mutations. *J Lipid Res.* 2001;42(5):751-9.

149. García-Monzón C, Lo Iacono O, Mayoral R, González-Rodríguez A, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodríguez T, et al. Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2011;54(1):142-52.
150. Sampson MJ, Davies IR, Braschi S, Ivory K, Hughes DA. Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2003;167(1):129-34.
151. Aguer C, Mercier J, Man CY, Metz L, Bordenave S, Lambert K, et al. Intramyocellular lipid accumulation is associated with permanent relocation ex vivo and in vitro of fatty acid translocase (FAT)/CD36 in obese patients. *Diabetologia*. 2010;53(6):1151-63.
152. Salamone F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease: the hepatic trigger of the metabolic syndrome. *J Hepatol*. 2010;53(6):1146-7.
153. Chmielewski M, Bragfors-Helin AC, Stenvinkel P, Lindholm B, Anderstam B. Serum soluble CD36, assessed by a novel monoclonal antibody-based sandwich ELISA, predicts cardiovascular mortality in dialysis patients. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):2079-82.
154. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1341-50.
155. Ballestri S, Lonardo A, Bonapace S, Byrne CD, Loria P, Targher G. Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(7):1724-45.
156. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis*. 2008;28(4):339-50.
157. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-85.
158. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1592-609.

159. Okumura T, Jamieson GA. Platelet glycoprotein. I. Orientation of glycoproteins of the human platelet surface. *J Biol Chem.* 1976;251(1):5944-9.
160. Alkhatatbeh MJ, Mhaidat NM, Enjeti AK, Lincz LF, Thorne RF. The putative diabetic plasma marker, soluble CD36, is non-cleaved, non-soluble and entirely associated with microparticles. *J Thromb Haemost.* 2011;9(4):844-51.

ANEXOS

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TRABAJO DE TESIS
DOCTORAL

